



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁷ : C07K 14/47, A61K 38/17, G01N 33/58, 33/86	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 00/20453 (43) Date de publication internationale: 13 avril 2000 (13.04.00)
---	-----------	--

(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR99/02329

(22) Date de dépôt international: 30 septembre 1999 (30.09.99)

(30) Données relatives à la priorité:
98/12366 2 octobre 1998 (02.10.98) FR(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): COMMISSARIAT A L'ENERGIE ATOMIQUE [FR/FR]; 31-33, rue de la Fédération, F-75752 Paris 15^{ème} (FR). UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE (PARIS VI) [FR/FR]; 4, place Jussieu, Tour Centrale, F-75252 Paris Cedex 05 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (US seulement): SANSON, Alain [FR/FR]; 2, avenue de la Villeneuve, F-91940 Gometz le Chatel (FR). RUSSO-MARIE, Françoise [FR/FR]; 105, rue des Bruyères, F-92310 Sèvres (FR). NEUMANN, Jean-Michel [FR/FR]; Bât.2 Les Quinconces, F-91190 Gif sur Yvette (FR). CORDIER-OCHSENBEIN, Françoise [FR/FR]; 12, rues des Patriarches, F-75005 Paris (FR). GUEROIS, Raphael [FR/FR]; 12, rue des Patriarches, F-75005 Paris (FR).

(74) Mandataire: DES TERMES, Monique; Brevatome, 3, rue du Docteur Lancereaux, F-75008 Paris (FR).

(81) Etats désignés: AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée

Avec rapport de recherche internationale.

(54) Title: CHEMICAL STRUCTURE WITH AFFINITY FOR A PHOSPHOLIPID, AND MARKER COMPOUND, DIAGNOSIS KIT, AND MEDICINE COMPRISING SAID STRUCTURE

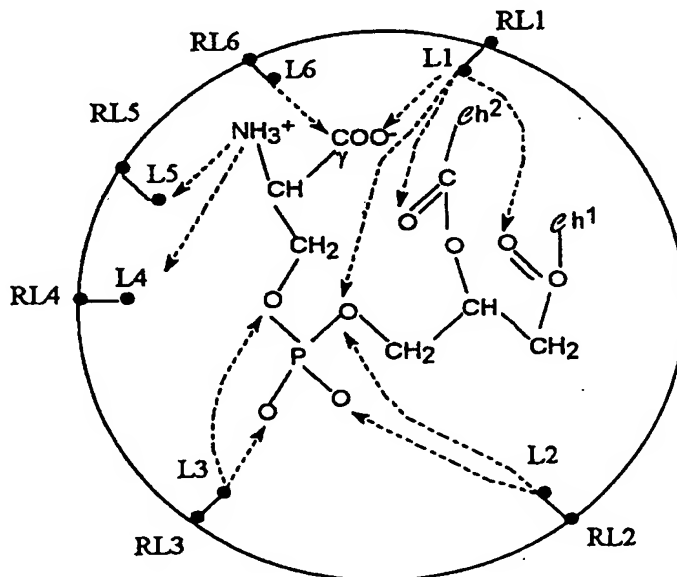
(54) Titre: STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN PHOSPHOLIPIDE, ET COMPOSE DE MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT COMPRENANT CETTE STRUCTURE

(57) Abstract

The invention concerns a compound with affinity for a negatively charged phospholipid and a detection molecule, a conjugate and a pharmaceutical composition containing said compound. Generally speaking, the compound of the invention is useful for specific recognition of lipid vectors and can be used for engineering and preparing compounds for identifying and sequestering negatively charged lipids, such as phosphatidyl serine and phosphatidic acid. Said chemical structure many have the construct (I).

(57) Abrégé

La présente invention se rapporte à un composé ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement ainsi qu'à une molécule de détection, à un conjugué et à une composition pharmaceutique comprenant ledit composé. De manière générale, le composé de la présente invention est utile pour la reconnaissance spécifique de vecteurs lipidiques. Il est utilisable pour l'ingénierie et la création de composés de reconnaissance et de séquestration de lipides chargés négativement, tels que la phosphatidyle sérine et l'acide phosphatidique. La structure chimique de la présente invention peut avoir la construction (I).



Composé (I) + phosphatidylsérine
COMPOUND (I) + PHOSPHATIDYLSERINE

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce			TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	ML	Mali	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MN	Mongolie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MR	Mauritanie	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MW	Malawi	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	MX	Mexique	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NE	Niger	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NL	Pays-Bas	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NO	Norvège	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	NZ	Nouvelle-Zélande		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PL	Pologne		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	PT	Portugal		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RO	Roumanie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	RU	Fédération de Russie		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SD	Soudan		
DK	Danemark	LR	Libéria	SE	Suède		
EE	Estonie			SG	Singapour		

**STRUCTURE CHIMIQUE AYANT UNE AFFINITE POUR UN
PHOSPHOLIPIDE, ET COMPOSE DE
MARQUAGE, TROUSSE DE DIAGNOSTIC, ET MEDICAMENT
COMPRENANT CETTE STRUCTURE**

5

DESCRIPTION

Domaine technique

La présente invention se rapporte à une structure
10 chimique ayant une affinité pour un phospholipide ainsi
qu'à une molécule de détection, à un conjugué et à une
composition pharmaceutique comprenant ladite structure.

De manière générale, la structure chimique de la
présente invention est utile pour la reconnaissance
15 spécifique de vecteurs lipidiques. Elle est utilisable
pour l'ingénierie et la création de composés de
reconnaissance et de séquestration de lipides notamment
de lipides chargés négativement, tels que la
phosphatidylsérine et/ou l'acide phosphatidique.

20 Ces lipides jouent un rôle important notamment
dans la signalisation cellulaire et peuvent être
présents à la surface externe des membranes des
cellules et/ou circuler dans le milieu sanguin à la
suite d'événements pathologiques très divers.

25 Divers événements cellulaires aboutissent à
l'apparition de phosphatidylsérine (PS) à la surface
externe des cellules, ces événements peuvent résulter
soit d'une altération fortuite ou pathologique de la
cellule, soit d'un événement cellulaire programmé telle
30 que la mort cellulaire ou apoptose. L'apparition de PS
à la surface externe des cellules constitue donc un
"message primaire" important témoignant de l'existence
d'un dysfonctionnement. Dans le cas du processus de

coagulation sanguine, le mécanisme est bien décrit :
l'altération des cellules endothéliales des vaisseaux
sanguins, soit pour des raisons accidentelles, soit
pour des raisons pathologiques plus complexes, provoque
5 l'apparition de ce message PS à la surface externe des
cellules en contact avec le milieu sanguin. Ce message
est immédiatement reconnu par certaines protéines
circulantes qui déclenchent alors une cascade
d'événements aboutissant au phénomène de coagulation
10 sanguine bien connu.

L'invention tire profit de la propriété de la
structure qu'elle fournit de se lier, en présence ou
non de calcium, aux lipides et notamment ceux chargés
négativement, pour la mise en point de composés
15 utilisables comme outils de recherche, de diagnostic et
de thérapeutique dans le domaine de la reconnaissance
des effecteurs lipidiques en général et de la détection
de l'apoptose, des troubles de la coagulation sanguine,
du choc septique et des pathologies inflammatoires
20 aiguës en particulier.

Concernant la recherche et le diagnostic, la
structure de l'invention peut par exemple être couplée
à des molécules de détection, par exemple à une
molécule fluorescente, au complexe avidine-biotine, à
25 un radioélément à vie courte, ou à un composé
paramagnétique. Avec ces molécules de détection, il est
possible par exemple de détecter des cellules
apoptotiques ou de reconnaître des microdomaines
membranaires chargés négativement.

30 La structure de la présente invention peut donc
être utilisée pour une détection "in vitro" de
pathologies impliquant l'apparition de charges

négatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules.

La structure de la présente invention peut également être utilisée lorsqu'elle est couplée par exemple à un radioélément à vie courte, pour une
5 détection "in vivo" de zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, en utilisant des systèmes d'imagerie. Cette structure peut par ailleurs être utilisée lorsqu'elle
10 est couplée à un composé paramagnétique tel qu'un complexe gadolinium pour une détection "in vivo" de zones thrombotiques, en particulier cérébrales, en utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Concernant la thérapeutique, de manière générale,
15 la structure de la présente invention peut être utilisée seule ou couplée à une molécule thérapeutique pour préparer un médicament utilisable par exemple par voie orale. Un tel médicament peut par exemple être
20 utilisé pour le ciblage de cette molécule vers des zones présentant des charges négatives telles que des tumeurs présentant des foyers de cellules apoptotiques ou des tumeurs inflammatoires.

La structure de la présente invention peut par exemple être couplée à des molécules à action
25 thrombolytique pour préparer un médicament qui peut être utilisé par exemple par voie orale en tant qu'anti-coagulant dans le traitement et la prophylaxie de la thrombose, ou pour préparer une molécule recouvrant tous les biomatériaux thrombogènes. La
30 structure de la présente invention peut donc être utilisée pour le ciblage des molécules thrombolytiques au site du thrombus ou vers les zones thrombogènes.

Dans un autre exemple d'application de la présente invention, la structure de l'invention peut être seule ou couplée à une molécule anti-inflammatoire pour préparer un médicament qui peut être utilisé par voie
5 orale, par exemple dans des pathologies aiguës comme l'asthme, la rectocolite hémorragique (RCH), le Crohn, le choc septique, les maladie du collagène et de l'arthrite.

10 **Etat de la technique**

Une famille de protéines, appelées annexines, ont été décrites dans l'art antérieur comme présentant un ancrage fonctionnel réversible à la membrane cellulaire, régulé par la concentration en calcium et
15 la présence de phospholipides anioniques. Les annexines constituent une famille de protéines exprimées dans des tissus très divers, aussi bien chez les animaux que chez les plantes. Il semble qu'elles ne sont ni exprimées chez la bactérie, ni chez la levure.

20 La structure des annexines comporte quatre domaines d'environ 70 acides aminés, ou résidus, très moyennement homologues en séquence mais de topologie quasiment identique.

La figure 1A en annexe est un schéma de la
25 topologie générale d'une annexine et la figure 1B en annexe est un schéma de la topologie d'un domaine de l'annexine portant un site calcium. Sur la figure 1A, C représente l'extrémité C-terminale de cette protéine, N représente l'extrémité N-terminale de cette protéine.
30 Les domaines, notés D1 à D4, sont associés en deux modules, l'un covalent D2D3, l'autre non covalent D1D4. Sur la figure 1B, A représente une première hélice α , B représente une deuxième hélice α , C représente une

troisième hélice α , D représente une quatrième hélice α , E représente une cinquième hélice α , et Ca représente l'atome de calcium. L'association de ces hélices constitue la structure consensus pour un
5 domaine d'annexine.

A l'heure actuelle, leurs rôles biologiques demeurent encore mal définis.

Dans le document WO 92/19279, J. TAIT décrit des conjugués ayant une affinité pour des phospholipides.
10 Il décrit en particulier l'utilisation de l'annexine, en particulier de l'annexine V, pour fabriquer un conjugué actif utilisable en tant qu'agent thrombolytique.

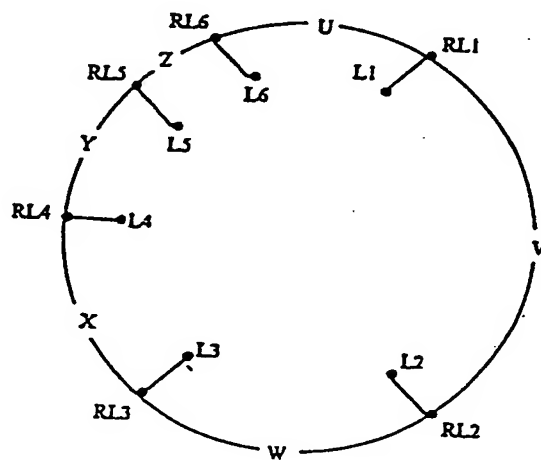
Malheureusement, le conjugué décrit dans ce
15 document est préparé à partir de l'annexine entière par un procédé de recombinaison génétique. De ce fait, il apparaît de nombreux inconvénients qui sont notamment un rendement faible, un coût de fabrication élevé, et l'obtention d'un conjugué fragile du fait de sa partie
20 protéique complexe.

Exposé de l'invention

La présente invention a précisément pour but de fournir une structure chimique ayant une affinité
25 spécifique avec un phospholipide. La structure chimique de l'invention présente notamment l'avantage d'être stable chimiquement et de pouvoir être fabriquée de manière reproductible, avec un rendement élevé et un coût de fabrication très réduit par rapport aux
30 composés de l'art antérieur.

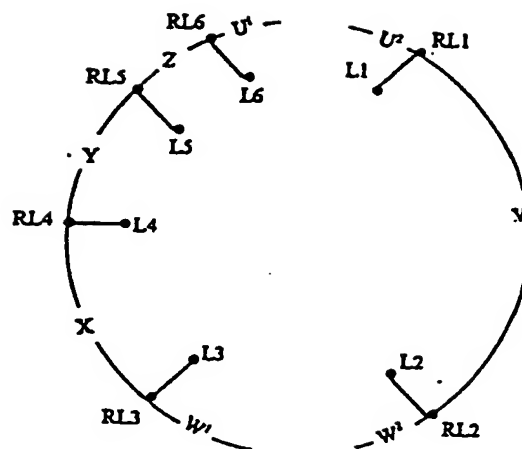
La structure de la présente invention se caractérise en ce qu'elle comprend au moins une plateforme chimique U, V, W, X, Y comportant six résidus

RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces fonctions chimiques définissant au moins en partie
5 l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :

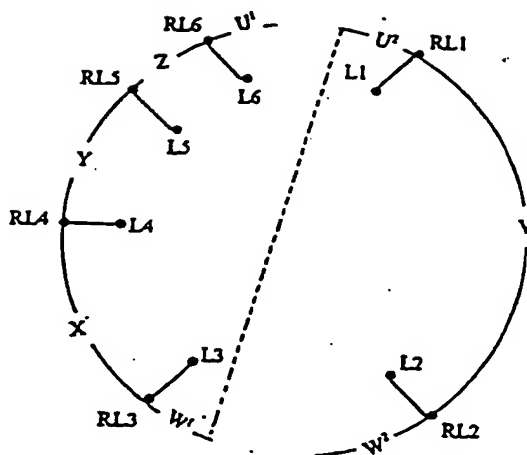


(I)

7



(II)



(III)

5

dans lesquelles U, U¹, U², V, W, W¹, W², X, Y, Z sont
indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel,
un peptide constitués d'acides aminés naturels ou non
naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s)
10 cyclique(s) carboné(s),

dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et
5 donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et dans lesquelles U, U¹, U², V, W, X, Y et Z sont tels que RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1 sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont
10 distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de
15 0,45 à 0,75 nm et L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), L1, L2, L3 et L6
20 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4 et L5 peuvent présenter chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

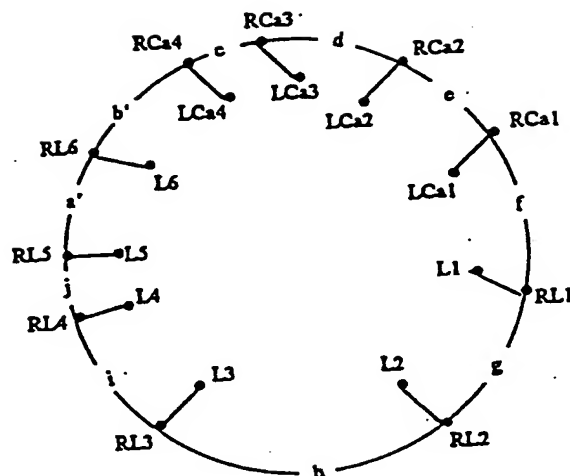
Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), U, V, W, X, Y et Z
25 peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 étant les fonctions chargées des chaînes
30 latérales desdits acides aminés.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II) ou (III), RL1 à RL6 peuvent être

disposés dans l'espace formé par U, V, W, X, Y, Z de manière à ce que les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement de leur chaîne latérales soient directement accessibles au phospholipide.

5 Selon l'invention, la structure de construction (I), (II) ou (III) peuvent comprendre en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.

10 La présente invention fournit également une structure chimique qui est caractérisé en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11 résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCa1, RCa2, RCa3, RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions chimiques
15 pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement, ces fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant au moins
20 en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :



(VI)

- dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),
- dans lequel RL1 à RL6 et RCa1 à RCa5 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 et LCa1 à LCa5 respectivement, lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions chimiques LCa1 à LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et
- dans lesquelles a dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à

0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm, RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte au niveau de a et/ou de h.

Lorsque les distances précédentes a, b, b' sont indiquées comme pouvant être nulles, on sous-entend que les deux ensembles (RL6-L6 et Rca5-Lca5) et/ou les deux ensembles (Rca4-Lca4 et Rca5-Lca5) et/ou les deux ensembles (RL6-L6 et Rca4-Lca4) constituent séparément un seul et même ensemble.

Les plates-formes selon l'invention sont constituées d'un ensemble de groupes chimiques

structuraux pouvant comprendre un nombre de groupes cycliques suffisants pour assurer une rigidité compatible avec l'affinité au phospholipide.

Les distances mesurées lorsque les RL et les RCA
5 sont des acides aminés, peuvent être mesurées entre les carbones α de ces acides aminés dans les structures (I) à (VI) précitées.

Ces structures peuvent être synthétisées par les procédés classiques de synthèse de la chimie organique
10 et de la chimie des protéines, par recombinaison génétique, par génie génétique, etc...

Des exemples de telles structures sont données notamment dans "Discovery of Sequence-Selective Peptide Binding by Synthetic Receptors Using Encoded
15 Combinatorial Libraries", W.C. Still, Acc. Chem. Res., 1996, 29, 155-163 et dans "Toward Synthetic Adrenaline Receptors : Strong, Selective and Biomimetic Recognition of Biologically Active Amino Alcohols by Bisphosphonate Receptors Molecules", T. Shrader, J.
20 Org. Chem., 1998, 63, 264-272.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), L1, L2, L3 et L6 peuvent présenter chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5,
25 LCa4, LCa3, LCa2 et LCa1 peuvent présenter chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), RL1, RL2, RL3 et RL6 peuvent être choisis indépendamment
30 parmi Arg, Lys, Orn ; RL4 peut être choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 peut être choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les

chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au phospholipides L1 à L6 respectivement.

5 Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k peuvent être des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 peuvent être des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et
10 Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 et LCa1 à LCa5 peuvent être les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCa1 à RCa5 peuvent être des acides aminés naturels ou non naturels.

Selon l'invention, dans la structure de construction (IV), (V) ou (VI), les carbones RL1 à RL6 et RCa1 à RCa2 peuvent être disposés dans l'espace formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et k de manière à ce que les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 respectivement et les charges positives du calcium
15 lorsque ce dernier est lié aux fonctions de liaison LCa1 à LCa5 soient directement accessibles au phospholipide.

Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), au moins une partie de la plate-forme peut être une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant au moins un desdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement de liaison au phospholipide.

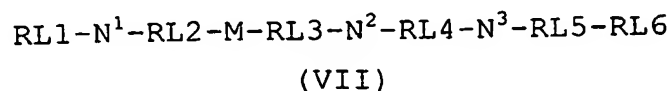
25 Selon l'invention, dans la structure de construction (I), (II), (III), (IV), (V) ou (VI), la plate-forme peut être une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine,
30

ladite partie du domaine de l'annexine comprenant lesdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement.

5 Selon l'invention, le domaine de l'annexine est choisi parmi le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.

10 Selon l'invention, les résidus ligands RL1 à RL6 peuvent être respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et
15 Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les résidus Lys100, Lys104, Lys138, Asp143, Ser146 et Glu147 du domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c, soit les résidus Arg97, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2
20 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les résidus Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du domaine 1 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

La présente invention fournit également une structure chimique ayant une affinité pour un
25 phospholipide caractérisée en ce qu'elle comprend une molécule de formule (VII) suivante :



30

dans laquelle N^1 à N^3 représentent chacun indépendamment de 1 à 4 des acides aminés choisis indépendamment, naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un

peptide constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou non naturels ;

dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL4 est choisi
5 indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite structure étant linéaire ou cyclique.

Selon l'invention, N¹ peut représenter trois acides aminés, N² peut représenter quatre acides
10 aminés, et N³ peut représenter deux acides aminés dans la structure de formule VII.

Dans la structure selon l'invention, M peut être par exemple un peptide constitué de 33 acides aminés naturels ou non naturels.

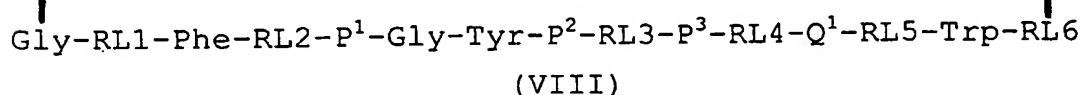
15 Selon l'invention, la structure de formule (VII) peut être une séquence peptidique choisie parmi la séquence peptidique allant de Arg124 à Ser171 dans la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence peptidique allant de Arg25 à Glu72 dans la séquence ID
20 n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, la séquence allant de Arg24 à Glu71 dans la séquence ID n°4 présentée sur la figure 6d, la séquence allant de Arg97 à Asp144 dans la
25 séquence ID n°5 présentée sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de ces séquences pourvu que RL1, RL2, RL3 et RL6 soient choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ;

RL4 choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 est
30 choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

La présente invention fournit également une structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, comprenant au moins une partie d'une

séquence peptidique choisie parmi la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, et les séquences ID n°4 et ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de celle-ci.

La présente invention fournit également une structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement, comprenant une séquence peptidique cyclique de formule (VIII) suivante :



15

dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ; dans laquelle P¹, P² et P³ sont choisis indépendamment parmi Ser et Thr ; dans laquelle Q¹ est choisi parmi Gly et Met.

Les structures chimiques précitées peuvent comprendre en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide chargé négativement. Le site calcium peut être par exemple un site calcium analogue à celui des annexines ou des phospholipides A2. Ces sites calcium sont connus par l'homme du métier.

Selon l'invention, toutes les structures chimiques précitées peuvent avoir une affinité pour un phospholipide choisi parmi une phosphatidylsérine, une phosphatidyléthanolamine, une phosphatidylinositol, un acide phosphatidique, et un cardiolipide, la ou les

chaîne(s) lipidique(s) des phospholipides peuvent par exemple comprendre de 4 à 23 atomes de carbone. Par exemple, le phospholipide peut posséder une chaîne d'acide arachidonique, par exemple pour la
5 phosphatidylsérine.

La présente invention fournit également un assemblage chimique ayant une affinité pour un phospholipide, comprenant au moins deux des structures chimiques de la présente invention, identiques ou
10 différentes, lesdites structures étant liées.

Par exemple, dans un assemblage chimique de la présente invention, au moins une des structures chimiques peut être une des structures chimiques peptidiques précédemment décrites.

15 Les assemblages selon l'invention peuvent donc être composés par exemple de structures identiques ou différentes. Par exemple, l'assemblage peut être un assemblage covalent convenable de deux structures selon l'invention, par exemple des domaines 1 et 4 selon
20 l'invention d'une même annexine. Cet assemblage peut par exemple comporter un domaine 4 selon l'invention modifié par génie génétique dans le but d'introduire un site calcium et phospholipidique identique à celui du domaine 1 de l'invention.

25 Ces domaines peuvent par exemple provenir des annexines I et V.

Ces assemblages peuvent avoir notamment pour but d'augmenter l'affinité des structures de la présente invention, pour le phospholipide, par exemple pour un
30 phospholipide chargé négativement. Ils peuvent être réalisés par exemple par insertion d'un lien peptidique flexible, par exemple poly-glycine, entre les structures chimiques de l'invention.

Les structures et assemblages de la présente invention présentent une affinité pour les phospholipides, et notamment pour ceux chargés négativement, meilleure que 0,1 μ M. Ils peuvent
5 comprendre une partie d'une annexine ou l'un de ses dérivés. Cette annexine peut être une annexine naturelle ou modifiée par les moyens classiques de la chimie ou du génie génétique.

La présente invention fournit également un procédé
10 de fabrication d'une structure chimique comprenant les étapes de préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte
15 appropriée pour une réplication du plasmide et la fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

Selon l'invention, dans ce procédé, le vecteur peut être un plasmide, par exemple le vecteur pGEX-2T.

20 Dans le procédé selon l'invention, la cellule hôte appropriée peut être par exemple *E. Coli*.

Par exemple, pour la fabrication de la structure selon l'invention, on peut partir du domaine 1 de l'annexine I et modifier la séquence de telle manière
25 que les résidus RL définis précédemment et éventuellement les résidus RCa apparaissent dans la séquence. Ainsi, par des procédés classiques de génie génétique, on peut fabriquer un cDNA codant pour la séquence modifiée et obtenir très facilement la
30 structure de la présente invention. La structure selon l'invention, lorsqu'elle présente au moins une partie peptidique peut également être fabriquée par un procédé classique de synthèse chimique en phase solide.

Un exemple de modification de la séquence du domaine 1 de l'invention de l'annexine I peut consister à remplacer His52 par Arg, Met56 par Lys ou Arg, Val57 par Gly, Val60 par Thr, éventuellement Lys90 par Arg, 5 Thr95 par Asp, Lys98 par Ser ou Thr, et Ala99 par Asp ou Glu. Ces modifications peuvent être faites sur d'autres domaines également.

Ces modifications peuvent avoir notamment pour rôle d'augmenter la stabilité générale de la structure 10 ou du domaine vis-à-vis de la température, du pH, et des conditions ioniques du milieu d'utilisation ; de diminuer ses propriétés éventuelles de toxicité générale envers l'organisme humain ; d'augmenter son affinité pour les phospholipides chargés négativement ; 15 et d'augmenter son affinité générale pour les membranes cellulaires.

Selon l'invention, la modification d'un domaine peut également avoir pour rôle de développer l'affinité de la structure pour un phospholipide, par exemple 20 chargé négativement ; et même de retrouver une affinité au moins égale à celle que possède l'annexine dite sauvage, en l'absence de calcium.

La modification peut par exemple porter sur le résidu dit résidu bidentate Asp ou Glu de calcium (RL6) 25 du ou des domaines portant un site phosphatidylsérine, pour les remplacer par l'un des résidus Lys ou Orn.

Une autre modification, par exemple du domaine 1 de l'annexine V peut consister à remplacer Glu 72 par Lys ou Orn, et/ou Thr 33 par Lys ou Orn.

30 Selon l'invention, la structure chimique ou l'assemblage de la présente invention peut être utilisée pour préparer un médicament.

Par exemple, le médicament peut être choisi parmi un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

5 Selon l'invention, la structure ou l'assemblage chimique selon l'invention peut être couplé à une molécule de marquage pour former un composé de marquage.

10 Selon l'invention, la molécule de marquage peut être choisie par exemple parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

La présente invention fournit aussi une trousse de diagnostic comprenant une structure ou un assemblage
15 précité.

Cette trousse de diagnostic peut par exemple comprendre en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

La présente invention fournit également une
20 trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure ou un assemblage chimique de la présente invention.

La présente invention fournit également une
25 trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure ou un assemblage chimique de la présente invention couplé à un marqueur.

30 D'autres avantages et caractéristiques de la présente invention apparaîtront encore à la lecture des exemples illustratifs et non limitatifs qui suivent, en référence aux figures en annexe.

Brève description des figures

- la figure 1A est une représentation schématique de la structure générale des annexines ;
- la figure 1B est une représentation schématique de la structure d'un domaine d'une annexine comportant un site calcium ;
- la figure 2 est un schéma illustrant l'insertion dans un vecteur PGEX-2T du cDNA codant pour la structure chimique de la présente invention pour produire ledit composé par génie génétique ;
- la figure 3 est une représentation schématique d'un spectre RMN ^1H du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I présentant la région des aliphatiques ;
- la figure 4 est une représentation graphique de la dénaturation du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I par le chlorure de guanidinium ;
- la figure 5 est une représentation graphique de la dénaturation thermique du domaine 1 de la présente invention de l'annexine I ;
- la figure 6a représente la séquence de l'annexine I, notée séquence ID n°1, dans laquelle la séquence du domaine 2 de la présente invention a été soulignée ;
- la figure 6b représente la séquence de l'annexine V, notée séquence ID n°2, dans laquelle la séquence du domaine 1 de la présente invention a été soulignée ;
- la figure 6c représente la séquence de l'annexine III, notée séquence ID n°3, dans

laquelle la séquence du domaine 2 de la présente invention a été soulignée ;

- 5 - la figure 6d représente la séquence de l'annexine IV, notée séquence ID n°4 et séquence ID n°5, dans laquelle la séquence des domaines 1 et 2 de la présente invention ont été soulignées ;
- 10 - la figure 7 est une représentation schématique de la structure de construction (I) de la présente invention liée à une molécule de phosphatidylsérine mettant en évidence les interactions entre les fonctions de liaison L1 à L6 de la structure de construction (I) de l'invention et une molécule de phosphatidylsérine ;
- 15 - la figure 8 est une représentation schématique des interactions entre les résidus ligands du domaine 1 de la présente invention de l'annexine V humaine représenté sur la figure 6b, et une molécule de phosphatidylsérine en présence d'un atome de calcium ;
- 20 - les figures 9A et 9B sont des photographies de gels de polyacrylamide qui illustrent la fixation de l'annexine V et de certains de ses mutants sur des membranes constituées de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine (surnageant S2).
- 25

EXEMPLES**Exemple 1 : Expression et purification des peptides de séquences ID n°1 et ID n°2 de la présente invention**

5 Les séquences ID n°1 et ID n°2 des annexines I et V ont été préparées par surexpression dans *E. Coli* selon le même protocole que celui qui a été décrit par F. Cordier-Ochsenbein et al. dans J. Mol. Biol. 279, 1177-1185.

10 Le cDNA de ces séquences d'annexines a été préparé en utilisant la PCR à partir du cDNA des annexines correspondantes. Le cDNA a été inséré dans le vecteur pGEX-2T (Smith & Jonhson, 1998). La figure 2 est un schéma illustrant l'insertion du cDNA dans le vecteur.

15 L'absence de mutations induites par la PCR a été contrôlée par séquençage. La production du peptide est effectuée en utilisant la souche *E. Coli* BL21 contenant le vecteur d'expression décrit plus haut. Après induction par l'isopropylthiogalactopyranoside (IPTG,

20 100 µm) jusqu'à une densité optique de 1 à 600 nm, la pousse est continuée jusqu'à ce qu'un plateau soit atteint, c'est-à-dire pendant environ 3 heures. Après centrifugation, les bactéries sont resuspendues dans le tampon de lyse comprenant 50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM

25 EDTA, 500 mM NaCl, 5% (v/v) glycérol, 1% (v/v) Triton X100, 1 mM dithiothréitol (DTT), 1 mM phénylméthylsulfonyl fluoride (PMSF) et 20 µg/ml aprotinine.

La purification a été effectuée de la façon

30 suivante : après sonification et centrifugation à 10000 g, le surnageant contenant les protéines solubles est incubé avec des billes de glutathion/agarose permettant la liaison spécifique à ces billes de la

protéine de fusion GST-domaine. Après lavage avec une solution contenant 1 M NaCl, 50 mM Tris-HCl à pH 8, 70 unités de thrombine par litre de culture sont ajoutés et la séquence est éluée.

5 La séquence est alors purifiée sur une colonne proRPC (marque de commerce) de type 16/10, fournie par la société Pharmacia en utilisant un système FPLC et un gradient linéaire d'eau de qualité Millipore (marque de commerce) contenant 0,1% (v/v) d'acide trifluoroacétique TFA, et d'acétonitrile contenant 0,1% de TFA. La vitesse d'écoulement est ajustée à 2,5 ml/minute. La séquence est ensuite lyophilisée. Le rendement final est d'environ 8 mg de séquence par litre de culture.

15

Exemple 2 : Stabilité de la séquence ID n°1 de l'annexine 1

Différentes expériences montrent que cette séquence constitue une protéine de repliement stable.

20 La figure 3 montre un spectre 1D de RMN ^1H du proton de la séquence ID n°1 isolée de l'annexine 1, en solution aqueuse. La dispersion des fréquences de résonance et la présence de résonances à des déplacements chimiques inférieurs à 0 ppm indiquent
25 clairement que cette séquence est fortement structurée. De plus, les données de déplacement chimique des protons α révèlent la présence de 5 hélices conformément à la structure cristallographique.

La figure 4 montre la dénaturation coopérative du
30 domaine 1 de l'annexine I issu de la séquence ID n°1 par le chlorure de guanidinium, qui est un dénaturant classique et la figure 5 montre la dénaturation coopérative de la séquence par la température.

Des données analogues sont obtenues pour les autres séquences décrites précédemment et démontrent que certaines séquences d'annexine se comportent comme de petites protéines de stabilité normale, utilisables
5 directement, ou comme plate-forme, pour l'ingénierie de composés fonctionnels nouveaux.

**Exemple 3-1 : Rôle essentiel du domaine 1 de l'annexine V issu de la séquence ID n°2 dans la liaison de
10 l'annexine V aux membranes**

Des expériences de liaison de l'annexine V à des systèmes membranaires modèles ainsi que des expériences d'inhibition de la protéine kinase c (PKC) *in vitro*, et de la phospholipase A₂ (PLA₂) cytoplasmique (cPLA₂) *in*
15 *vivo* démontrent le rôle essentiel joué par le domaine 1 dans cette liaison aux membranes.

On prend ici comme exemple le cas de l'inhibition de la cPLA₂. L'inhibition de l'activité phospholipasique par l'annexine V résulte de la
20 déplétion du substrat lipidique commun à ces deux protéines. Divers mutants de l'annexine V ont été construits pour éliminer de façon sélective dans un ou plusieurs domaines la capacité de lier le calcium, c'est-à-dire les phospholipides. La mutation consiste à
25 remplacer le ligand bidentate du calcium, Glu ou Asp, d'une séquence de la présente invention par un résidu non liant, Gln ou Asn respectivement. Douze mutants ont ainsi été construits et purifiés : M1, M2, M3, M4, M1M2, M1M3, M1M4, M2M3, M1M2M3, M1M2M4, M2M3M4 et
30 M1M2M3M4, le chiffre indiquant le domaine pour lequel la capacité de lier le calcium a été supprimée. L'ensemble des résultats montre que l'activité phospholipasique de la PLA₂ cellulaire, mesurée par le

taux de relarguage d'acide arachidonique, dépend fortement de la présence du site calcium dans le domaine 1 et à un moindre degré dans le domaine 4. La suppression des sites calcium dans les domaines 2 et 3 n'a quasiment aucun effet sur l'inhibition de l'activité phospholipasique de la cPLA₂. (Mira et al. J. Biol. Chem. 1997, 272:10474-10482 ; Dubois et al. Biochem. J. 1998, 330:1277-1282).

Le tableau (I) suivant regroupe certains résultats de cet exemple, et montre le pourcentage de diminution de la liaison des mutants de l'annexine V aux phospholipides par rapport à l'annexine V sauvage.

Annexine V sauvage	M1	M2	M3	M4	M1M2M3	M1M2M4
0	79 ₊₆	38 ₊₄	47 ₊₉	38 ₊₆	98 ₊₁	85 ₊₇

Ce tableau (I) montre la liaison aux membranes de l'annexine V et de ses mutants M1, M2, M3, M4, M1M2M3 et M1M2M4. Les résultats sont exprimés en pourcentage de diminution de la capacité de liaison par rapport à l'annexine V sauvage (valeur moyenne \pm erreur standard). Pour les mutants M123 et M124, le taux de liaison résiduel n'est pas significatif.

Exemple 3-2 : Résultats préliminaires concernant la liaison de l'annexine V et de divers mutants aux membranes modèles composées de phosphatidylcholine et de phosphatidylsérine

Les mutants suivants de l'annexine V humaine ont été préparés selon les méthodes décrites dans l'exemple 1 :

M1M2M3M4 : le site calcium principal, correspondant à la boucle AB, est supprimé dans tous les domaines par une mutation du ligand bidentate.

5 M2M3M4 : le site calcium principal des domaines 2,3 et 4 est supprimé par une mutation du ligand bidentate, celui du domaine 1 subsiste.

M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser : suppression des ligands L2 et L3 du site PS de la présente invention.

10 M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29Ala-
Asp68Ile/Phe/Trp : suppression de tous les ligands du site PS de la présente invention sauf ceux concernant le site calcium qui eux
15 sont conservés.

La liaison aux membranes PC/PS des mutants de l'annexine V est alors comparée à celle de la forme sauvage selon le protocole suivant :

Un mélange homogène de PC/PS dans une proportion
20 80/20 est mis en suspension dans des solutions contenant des concentrations variables de calcium à 0, 30, 100, 1000 μ M. Les diverses protéines sont ensuite introduites et incubées pendant quelques minutes. La suspension est ensuite centrifugée par
25 ultracentrifugation à 90000 t/mn. Les membranes sédimentent au fond du tube. Le surnageant, appelé S1, est entièrement prélevé pour analyse ultérieure du contenu en protéine qui donnera l'information sur la quantité de protéine non liée à la membrane. Le culot
30 de membrane est ensuite dispersé dans une solution contenant de l'EDTA en quantité suffisante pour le relargage des protéines, la liaison de l'annexine V étant réversible et dépendante du calcium. La

suspension est de nouveau centrifugée et un second surnageant, appelé S2, est récupéré. L'analyse du contenu en protéine de S2 fournira l'information concernant la quantité des protéines qui étaient fixées à la membrane.

L'analyse des surnageants est effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide d'une façon classique qu'il est inutile de décrire ici.

Les figures 9A et 9B en annexe montrent l'ensemble des résultats.

Sur cette figure :

Sauvage : A5 = annexine V

Mutants :

D68F=M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29Ala-Asp68Phe
D68I=M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29Ala-Asp68Ile
D68W)M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29ala-Asp68Trp
1,2,3,4=concentration en calcium respectivement 0,30,
100, 1000 μ M

T=témoins de masse moléculaire

Le comportement des mutants M1M2M3M4 et M2M3M4, comparé à celui de l'annexine V sauvage montre clairement que la liaison aux membranes en présence de calcium est quasi uniquement assurée par le domaine 1, c'est-à-dire qui contient le site PS revendiqué. Ce résultat confirme ceux présentés dans l'exemple 3-1 précédent.

Le comportement des mutants M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser et M2M3M4-Arg22Ala-Arg63Ser-Lys29Ala-Asp68Ile/Phe/Trp montre que la liaison aux membranes est considérablement atténuée lorsque les ligands L2, L3, L4 et L5 sont supprimés. La liaison n'est cependant pas totalement supprimée dans la mesure où les ligands Lca5, Ca qui font partie du site calcium subsistent et

permettent encore une liaison de la PS mais avec une affinité très diminuée.

Exemple 4 : Utilisation de la structure chimique de la présente invention

Trois voies d'utilisation sont prévues : i) simple ingénierie des domaines pour satisfaire aux diverses exigences liées à leur utilisation comme outils de recherche, de diagnostic et de thérapeutique ; ii) "re-design" de la plate-forme qui constitue la topologie du domaine en une nouvelle plate-forme plus simple et synthétisable par voie chimique ou par génie génétique ; iii) remplacement de la plate-forme peptidique ou peptoïdique par une structure organique non-peptidique pour la fabrication d'un médicament. Dans les trois cas, il s'agit naturellement de conserver, voire d'améliorer, la localisation spatiale des fonctions de liaison avec les phospholipides, décrits plus haut.

1) Ingénierie des domaines d'annexines

Les domaines d'annexines de la présente invention constituent des plates-formes peptidiques. On entend par ingénierie la modification de la séquence des domaines par mutagénèse afin d'améliorer la stabilité générale de la molécule et de l'adapter aux conditions physico-chimiques imposées par l'utilisation, d'améliorer son affinité pour le ligand phospholipidique, et lui conférer une spécificité propre à chaque phospholipide. Il s'agit aussi de permettre l'introduction de différents marqueurs pour les différentes applications dont il est question plus

loin. Nos connaissances actuelles sont largement suffisantes pour effectuer une telle ingénierie.

Les exemples d'un changement de propriété ont été illustrés dans l'exemple 4 Ils ont été obtenus par une technique classique de génie génétique en mutant les acides aminés impliquées.

2) "Re-design" des plates-formes peptidiques

Le "re-design" de la plate-forme consiste à redéfinir une architecture moléculaire, tout en gardant la topologie convenable des résidus impliqués dans la liaison au calcium et aux phospholipides. L'intérêt du "re-design" est de créer une plate-forme de séquence plus courte pouvant être produite par synthèse chimique. La synthèse d'un peptide de la taille d'un domaine est possible mais reste difficile. La réduction par deux du nombre de résidus, soit environ 35 résidus, rend par contre la synthèse couramment réalisable. Dans cette opération de "re-design", on conserve assez précisément la géométrie permettant des interactions avec le phospholipide, et notamment la disposition des résidus de la séquence annexine. Ces résidus sont ceux indiqués en gras sur les figures 6a à 6d pour les annexines (I) à (V).

Cet ensemble comprend deux résidus basiques, généralement Arg-x-x-x-Lys, à la fin de l'hélice A du domaine concerné et une série de résidus acides, basiques et neutres, généralement Arg-x-x-x-x-Asp-x-x-Ser-Asp, situés dans l'hélice D. L'étude de la structure moléculaire montre, figures 7 et 8, que ces résidus sont parfaitement disposés pour lier une molécule de phosphatidylsérine. Le groupe carboxylate de ce lipide est lui-même lié à l'atome de

calcium situé dans la boucle AB et désigné dans la suite par "site calcium AB".

La séquence :

5 **Arg-x-x-x-Lys** (hélice A) ---- **Arg-x-x-x-x-Asp-x-x-Ser-Asp** (hélice D)

associée à celle du site calcium AB, constitue donc une séquence consensus pour la liaison de la phosphatidylsérine dans les composés de la présente invention. Pour généraliser, on désignera maintenant cette séquence par :

RL1-x-x-x-RL2----RL3-x-x-x-x-RL4-x-x-RL5-RL6

15 où RL1 à RL6 sont les résidus ligands essentiels dans la liaison de la phosphatidylsérine indiqués en gras dans les séquences des figures 6a à 6d et indiqué dans les composés de structure (I) à (VI). La séquence consensus du site calcium AB est la suite :

20

Met-Lys-Gly-x-Gly-Thr----Asp(ou Glu)

Les ligands du calcium sont les groupes carboxyl peptidiques des résidus en italique (résidus de la boucle AB) sur la figure et les deux atomes d'oxygène du groupe carboxylate de la chaîne latérale du résidu Asp (ou Glu) de la fin de l'hélice D, dénommé aussi ligand bidentate. En généralisant ces ligands du calcium seront maintenant désignés par :

30

RCa1-RL2-RCa2-x-RCa3-Thr----(RCa4RCa5) ou RL6

Dans le cas de l'annexine, RCa4 et RCa5 constituent un seul et même résidu déjà identifié précédemment comme RL6.

5 Les données de distances interatomiques entre les résidus ligands sont donnés dans le tableau (II) suivant en référence à la figure 7 en annexe et les interactions précises domaine-calcium-phosphatidylsérine sont indiquées dans le tableau (III) suivant en référence à la figure 8 en annexe.

10 Sur la figure 8, Ch1 et Ch2 représentent la position d'éventuelles chaînes carbonnées du phospholipide. Ces chaînes peuvent être celles décrites, par exemple l'acide arachidonique.

Selon l'invention, la structure chimique peut être
15 constituée de la façon suivante :

a) elle comporte en particulier au moins 6 résidus, dits résidus ligands, nommés RL1 à RL6 et dont la nature est la suivante :

20 RL1 = Arg ou Lys ou Orn
RL2 = Arg ou Lys ou Orn
RL3 = Arg ou Lys ou Orn
RL4 = Asp ou Glu
RL5 = Ser ou Thr ou Asp ou Glu
RL6 = Arg ou Lys ou Orn

25 b) les carbones α des résidus ligands RL1 à RL6 sont disposés dans l'espace de manière à ce que les chaînes latérales soient directement accessibles aux phospholipides,

30 c) les carbones α des résidus ligands RL1 à RL6 sont disposés selon le tableau II de distances suivant :

Carbone α	RL2	RL3	RL4	RL5	RL6
RL1	0,45 à 0,65	0,7 à 1,2	0,7 à 1,0	0,85 à 1,15	0,65 à 0,95
RL2		0,5 à 1,05	0,8 à 1,2	1,2 à 1,7	0,9 à 1,4
RL3			0,5 à 0,8	1,0 à 1,3	1,2 à 1,7
RL4				0,45 à 0,75	0,7 à 1,2
RL5					0,4 à 1,2

d) les chaînes latérales des résidus ligands RL1 à RL6 permettent d'établir un réseau de liaisons hydrogène avec la phosphatidylsérine selon le schéma où les flèches \longrightarrow désignent au moins une liaison hydrogène, figure 8, dans le sens donneur vers accepteur et L1 à L6 désignent les ligands de la phosphatidylsérine selon la liste suivante :

- 10 L1 = NZLys ou CZArg de LR1
- L2 = NZLys ou CZArg de LR2
- L3 = NZLys ou CZArg de LR3
- L4 = CGAsp ou CDGlu de LR4
- L5 = CB de Ser ou Thr ou CG de Asp ou CD de Glu de LR5
- 15 L6 = NZLys ou CZArg de LR6

HN = H

NZ = N zeta

CZ = C zeta

20 OD = O delta

OG = O gamma

OE = O epsilon

où les distances entre les ligands L1 à L6 et les atomes de la phosphatidylsérine sont données dans le tableau III suivant :

5 Distances nm x 10

	N	C β	C γ	O1	O2	O3	O4	Cl chaîne Ch1	Cl chaîne Ch2
L1	0,35 à 0,65	0,3 à 0,5	0,25 à 0,45	0,2 à 0,35	0,25 à 0,5	0,35 à 0,6	0,2 à 0,35	0,4 à 0,7	0,5 à 0,8
L2	0,55 à 0,85	0,45 à 0,75	0,45 à 0,75	0,4 à 0,6	0,2 à 0,4	0,4 à 0,6	0,25 à 0,45	0,7 à 1,1	0,7 à 1,1
L3	0,4 à 0,6	0,4 à 0,6	0,45 à 0,75	0,4 à 0,6	0,2 à 0,4	0,2 à 0,35	0,25 à 0,5	0,7 à 1,1	0,6 à 1,0
L4	0,25 à 0,45	0,3 à 0,5	0,35 à 0,55	0,55 à 0,85	0,5 à 0,75	0,4 à 0,65	0,4 à 0,6	0,8 à 1,2	0,8 à 1,2
L5	0,25 à 0,5	0,45 à 0,65	0,5 à 0,75	0,65 à 0,95	0,65 à 0,95	0,5 à 0,8	0,5 à 0,9	0,8 à 1,2	0,6 à 1,0
L6	0,3 à 0,5	0,35 à 0,55	0,3 à 0,45	0,65 à 0,95	0,7 à 1,0	0,65 à 0,95	0,5 à 0,8	0,6 à 1,0	0,8 à 1,2

Pour le ligand L1, deux au moins des cinq distances indiquées dans ce tableau sont de préférence respectées.

3) Plate-forme organique

La troisième étape constitue l'étape ultime pour l'obtention d'un médicament facilement utilisable par voie orale. Il s'agit du remplacement de la plate-forme peptidique par une structure organique respectant la disposition spatiale des ligands phospholipidiques. Les ligands calciques et phospholipidiques ne sont plus des

résidus aminoacides mais des fonctions chimiques reproduisant les interactions décrites plus haut.

Les structures organiques couramment utilisées en pharmacologie peuvent permettre de construire des
5 plates-formes rigides capables de présenter un site de liaison pour le phospholipide selon l'invention. Ces structures peuvent être constituées par les techniques chimiques classiques connues de l'homme du métier, qu'il n'est pas nécessaire ici de rappeler.

10

Exemple 5 :

De manière très avantageuse, l'utilisation d'une structure ou d'un assemblage de la présente invention peut se faire comme indiqué précédemment dans trois
15 directions : recherche, diagnostic et thérapeutique.

1) la recherche

Pour ces expériences, il convient de coupler une structure de la présente invention à une molécule de
20 marquage permettant une détection. Ces molécules de marquage peuvent être celles précitées par exemple des molécules fluorescentes, un système avidine-biotine, des radioéléments, et de manière générale, celles couramment utilisées.

25

2) le diagnostic

Les structures chimiques et assemblages de la présente invention peuvent comme indiqué précédemment être utilisés pour la détection "in vitro" de
30 pathologies impliquant l'apparition de charges négatives à la surface des cellules et la libération dans le sang de microvésicules : par exemple les

troubles de la coagulation, les pathologies inflammatoires aiguës, etc...

Ils peuvent aussi être couplés à des radioéléments à vie courte et détection "in vivo" de la localisation des zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, utilisant des systèmes d'imagerie.

Ils peuvent aussi être couplés à des composés paramagnétiques, par exemple un complexe de gadolinium, et détection "in vivo" de la localisation des zones thrombotiques lors d'accidents vasculaires de toute sorte, en particulier cérébraux, utilisant l'imagerie par résonance magnétique (IRM).

Les couplages précités peuvent être réalisés par les techniques classiques de chimie organique connues de l'homme du métier, qu'il n'est pas utile ici de rappler.

3) le médicament

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent être utilisés en tant que tels pour fabriquer un médicament utilisable pour un traitement ou pour une prophylaxie car ils possèdent des propriétés anticoagulante, antithrombolytique et anti-inflammatoire intrinsèques.

Les assemblages selon l'invention permettent d'effectuer un tapissage des surfaces cellulaires, capable d'interdire l'accès de composés impliqués dans les étapes primaires de la coagulation sanguine et les phénomènes inflammatoires à ces surfaces.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent également être utilisés pour le

ciblage de molécules à un site du thrombus, de l'inflammation, ou vers une zone tumorale.

Dans cette utilisation, les structures et assemblages de la présente invention sont couplés à une
5 molécule qui a une action thrombolytique, à une molécule qui a une action anti-inflammatoire, ou à une molécule qui a une action anti-tumorale respectivement.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent donc être utilisés par exemple pour
10 fabriquer un médicament utilisable dans le traitement et la prophylaxie de la thrombose. Le couplage des structures et assemblages à des molécules à action thrombolytique permet un ciblage de ces dernières vers les zones thrombogènes. Les molécules thrombolytiques
15 telles que les streptokinases, les urokinases, et les activateurs du plasminogène peuvent être utilisées.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent aussi être utilisés couplés à une molécule ayant une action anti-inflammatoire pour
20 fabriquer un médicament utilisable par exemple par voie locale ou par voie orale dans des pathologies aiguës comme l'asthme, la RCH, le Crohn, le choc septique, les maladies du collagène et l'arthrite.

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent aussi être utilisés couplés à une molécule ayant une action antitumorale. Ce couplage permet de cibler ces dernières molécules vers des zones présentant des charges négatives telles que des tumeurs possédant des foyers cellules apoptotiques, des tumeurs
25 inflammatoires, etc...
30

Les structures et assemblages de la présente invention peuvent également être utilisés pour fabriquer un matériau de recouvrement de biomatériaux

susceptibles d'être thrombogènes. Un biomatériau thrombogène ainsi recouvert perd ses propriétés thrombogènes. Le biomatériau thrombogène peut être par exemple une valve cardiaque.

5 L'invention propose d'utiliser une structure chimique dérivée des protéines de la famille des annexines et leurs domaines isolés, modifiés ou non, capables de se lier réversiblement aux effecteurs lipidiques tel que les phosphatidylsérines, les acides
10 phosphatidiques, les phosphatidyléthanolamines et les phosphatidylinositophosphates. Il s'agit de fournir un ensemble de composés protéiques, peptidiques, peptoïdes et organiques dont la propriété principale est de reconnaître spécifiquement l'apparition des signaux
15 lipidiques à la surface des membranes cellulaires en relation avec le fonctionnement normal ou pathologique des tissus. Les pathologies spécialement visées par l'invention sont : (i) les troubles de la coagulation sanguine, (ii) les phénomènes d'apoptose consécutifs à
20 l'action de composés chimiques, d'effets physiques comme les radiations ionisantes, d'effets biologiques comme ceux liés à la formation ou la nécrose des tissus cancéreux, outre les phénomènes normaux d'apoptose, (iii) les pathologies inflammatoires aiguës et (iv) les
25 troubles associés aux relations entre les cellules et la matrice extra-cellulaire et notamment le collagène.

Outre l'ingénierie complète des annexines entières, un des aspects de l'invention est l'utilisation de domaines et de modules covalents
30 d'annexines soit directement soit comme plate-forme pour l'ingénierie de composés peptidiques fonctionnels. Il s'agit donc d'utiliser ces domaines et modules soit sous leur forme naturelle, soit modifiés par les voies

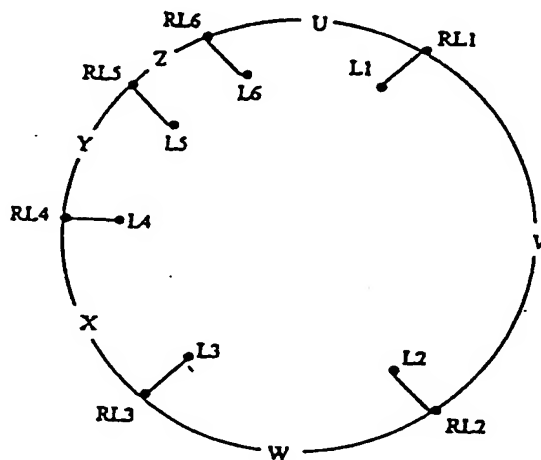
de la mutagénèse ou de la chimie, pour en faire des composés répondant aux critères biologiques exposés dans le paragraphe précédent.

De par leur faible taille, ces domaines peuvent
5 être facilement associés à d'autres protéines soit pour former des protéines chimères multifonctionnelles, soit pour introduire un mécanisme de régulation par des effecteurs autres que les phospholipides de signalisation. De plus, l'invention se propose de
10 redéfinir, par les méthodes de l'ingénierie des protéines, la spécificité des domaines pour les différents lipides de signalisation évoqués plus haut.

L'invention propose enfin de reconstruire ces domaines, par de novo design, pour en faire des
15 composés de taille plus restreinte et accessible à la synthèse peptidique et en particulier à l'introduction de résidus aminoacides non naturels dans le but d'augmenter la durée de vie de ces composés dans l'organisme.

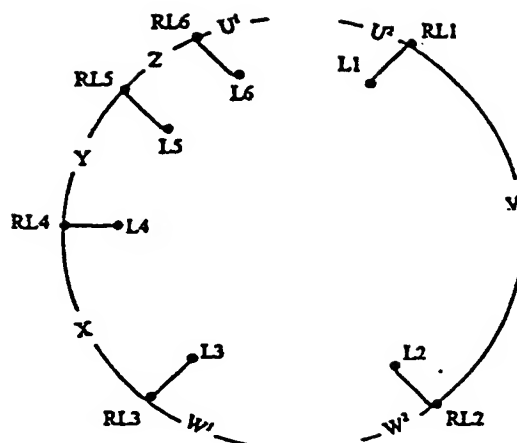
REVENDEICATIONS

1. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique U, V, W, X, Y comportant six résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, ces fonctions chimiques L définissant au moins en partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (I), (II) et (III) suivantes :

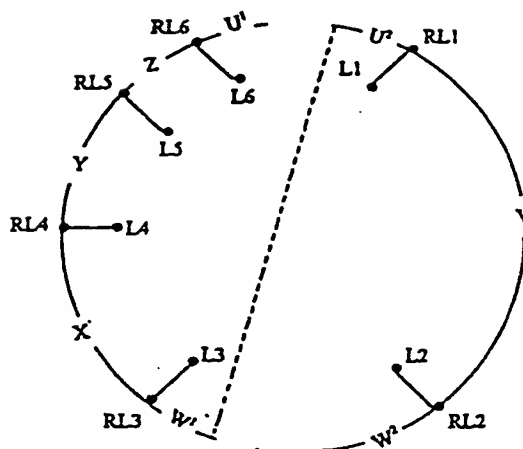


(I)

42



(II)



(III)

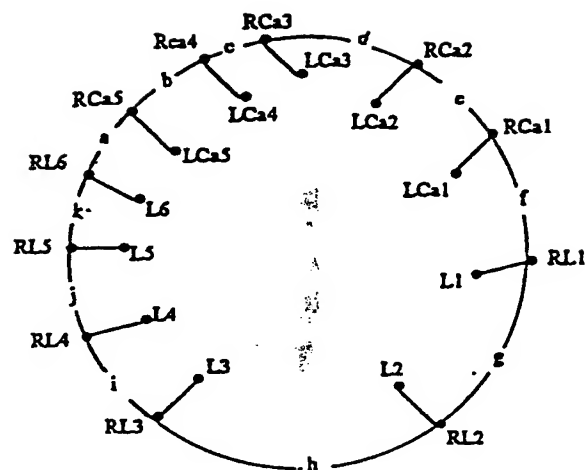
5

dans lesquelles U , U^1 , U^2 , V , W , W^1 , W^2 , X , Y , Z sont
indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel,
un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non
naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s)
10 cyclique(s) carboné(s),

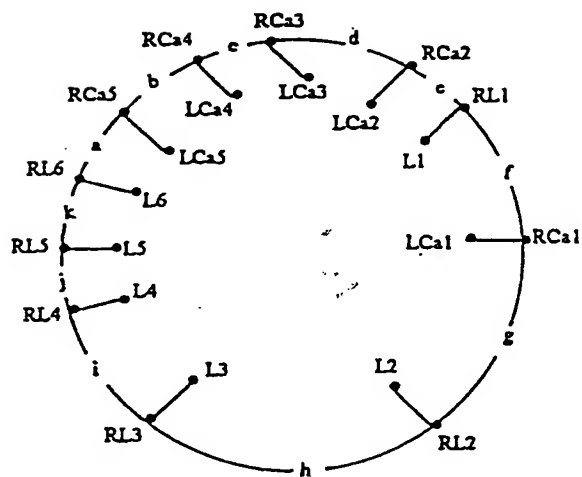
dans lesquelles RL1 à RL6 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement, lesdites fonctions chimiques comprenant soit au moins une charge positive et
5 donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, et dans lesquelles U, U¹, U², V, W, X, Y et Z sont tels que RL6 et RL1 sont distants de 0,65 à 0,95 nm, L6 et L1 sont distants de 0,65 à 0,9 nm, RL1 et RL2 sont
10 distants de 0,45 à 0,65 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de
15 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm.

2. Structure chimique ayant une affinité pour un
20 phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une plate-forme chimique a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l comportant 11 résidus RL1, RL2, RL3, RL4, RL5, RL6, RCa1, RCa2, RCa3, RCa4 et RCa5 supportant un ensemble de fonctions chimiques pouvant
25 se lier audit phospholipide appelées L1, L2, L3, L4, L5, L6 respectivement, et un ensemble de fonctions chimiques de liaison à un atome de calcium appelées LCa1, LCa2, LCa3, LCa4, LCa5 respectivement, ces fonctions chimiques RL1 à RCa5 définissant au moins en
30 partie l'affinité de ladite structure pour ledit phospholipide, ladite structure ayant une des constructions (IV), (V) et (VI) suivantes :

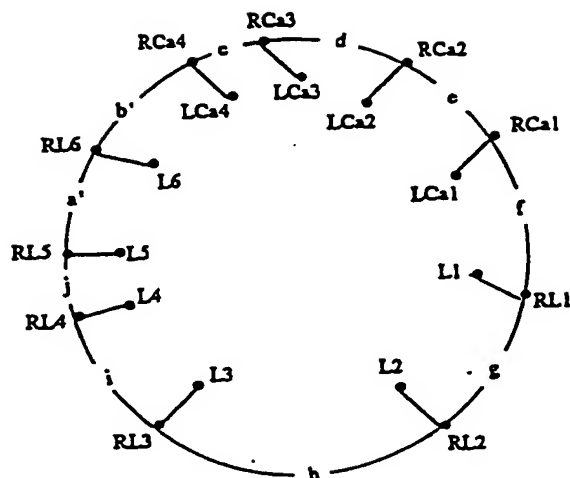
44



(IV)



(M)



(VI)

dans lesquelles a, a', b, b', c, d, e, f, g, h, i, j, k, l sont indépendamment un acide aminé naturel ou non naturel, un peptide constitué d'acides aminés naturels ou non naturels, une chaîne carbonée, ou un ou des groupe(s) cyclique(s) carboné(s),
 dans lesquelles RL1 à RL6 et RCa1 à RCa5 sont choisis parmi des molécules présentant les fonctions chimiques de liaison L1 à L6 et LCa1 à LCa5 respectivement, lesdites fonctions chimiques L1 à L6 comprenant soit au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, soit au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène, lesdites fonctions chimiques LCa1 à LCa5 comprenant un atome d'oxygène, et dans lesquelles a dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RL6 et RCa5 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa5 sont distants de 0 à 0,3 nm, b dans les structures de construction (IV) et (V) est tel que RCa5 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que LCa5 et LCa4 sont distants de 0,2 à

0,3 nm, b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, c et d sont tels que RCa4 et RCa3 sont distants de 0,5 à 0,9 nm, LCa4 et LCa3 sont distants de 0,2 à 0,4 nm, RCa3 et RCa2 sont distants de 0,35 à 0,6 nm, et LCa3 et LCa2 sont distants de 0,22 à 0,3 nm, e, f, g, dans les structures de construction (IV), (V), (VI) sont tels que RL1 et RL2 sont distants de 0,45 à 0,65 nm, RCa1 à RCa2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, L1 et L2 sont distants de 0,4 à 0,55 nm et LCa1 et LCa2 sont distants de 0,3 à 0,4 nm, h, i, j et k sont tels que RL2 et RL3 sont distants de 0,5 à 1,05 nm, L2 et L3 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, RL3 et RL4 sont distants de 0,5 à 0,8 nm, L3 et L4 sont distants de 0,35 à 0,5 nm, RL4 et RL5 sont distants de 0,45 à 0,75 nm, L4 et L5 sont distants de 0,4 à 0,55 nm, RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm, et L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, a' dans la structure de construction (VI) est tel que RL5 et RL6 sont distants de 0,4 à 1,2 nm et tel que L5 et L6 sont distants de 0,4 à 0,6 nm, et b' dans la structure de construction (VI) est tel que RL6 et RCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm et tel que L6 et LCa4 sont distants de 0 à 0,35 nm, la structure pouvant être soit fermée, soit ouverte en a et/ou en h.

3. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacun au moins une charge positive et donneuse de liaisons hydrogène, et L4 et L5 présentent chacun au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

4. Structure chimique selon la revendication 2, dans laquelle L1, L2, L3 et L6 présentent chacune au moins une charge positive et donneuse de liaison hydrogène, et L4, L5, LCa5, LCa4, LCa3, LCa2 et LCa1
5 présentent chacune au moins une charge négative et acceptrice de liaison hydrogène.

5. Structure chimique selon la revendication 1, dans laquelle U, V, W, X, Y et Z sont des peptides
10 constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides
15 aminés.

6. Structure chimique selon la revendication 1 ou 2, dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Arg, Lys, Orn,
20 dans laquelle RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et dans laquelle RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, les chaînes latérales de ces acides aminés présentant les fonctions chimiques de liaison au
25 phospholipide L1 à L6 respectivement.

7. Structure chimique selon la revendication 3 ou 4, dans laquelle RL1 à RL6 sont disposés dans l'espace formé par U, V, W, X, Y, Z de manière à ce que les
30 fonctions chimiques de liaison L1 à L6 respectivement de leur chaîne latérales soient directement accessibles au phospholipide chargé négativement.

8. Structure chimique selon la revendication 1, comprenant en outre un site calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide.

5

9. Structure chimique selon la revendication 2, dans laquelle a ou a', b ou b', c, d, e, f, g, h, i, j, k sont des peptides constitués d'acides aminés naturels ou non naturels, et RL1 à RL6 sont des acides aminés choisis dans un ensemble comprenant Lys, Arg, Orn, Ser, Thr, Asp et Glu, ou des analogues de ceux-ci, L1 à L6 et LCa1 à LCa5 étant les fonctions chargées des chaînes latérales desdits acides aminés, et RCa1 à RCa5 étant des acides aminés naturels ou non naturels.

15

10. Structure chimique selon la revendication 8, dans laquelle RL1 à RL6 et RCa1 à RCa2 sont disposés dans l'espace formé par a, b, c, d, e, f, g, h, i, j et k de manière à ce que les fonctions chimiques de liaisons L1 à L6 respectivement et les charges positives du calcium lorsqu'il est lié aux fonctions de liaison LCa1 à LCa5 soient directement accessibles au phospholipide.

25

11. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications précédentes, dans laquelle au moins une partie de la plate-forme est une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant au moins un desdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement de liaison au phospholipide.

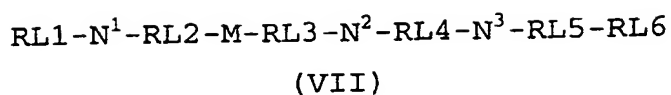
30

12. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans laquelle la plate-forme est une partie d'un domaine de l'annexine ou d'un domaine modifié de l'annexine, comprenant lesdits résidus ligands RL1 à RL6 présentant lesdites fonctions L1 à L6 respectivement.

13. Structure chimique selon la revendication 12, dans laquelle le domaine de l'annexine est choisi parmi le domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, le domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, le domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c et le domaine 1 et 2 de l'annexine IV présentés sur la figure 6d.

14. Structure chimique selon la revendication 13, dans laquelle les résidus ligands RL1 à RL6 sont respectivement soit, les résidus Arg25, Lys29, Arg63, Asp68, Ser71 et Glu 72 du domaine 1 de l'annexine V présenté sur la figure 6b, soit les résidus Arg124, Lys128, Arg162, Asp167, Ser170 et Asp171 du domaine 2 de l'annexine I présenté sur la figure 6a, soit les résidus Lys100, Lys104, Lys138, Asp143, Ser146 et Glu147 du domaine 2 de l'annexine III présenté sur la figure 6c, soit les résidus Arg97, Lys101, Arg135, Asp140, Ser143 et Asp144 du domaine 2 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d, soit les résidus Arg24, Lys28, Arg62, Asp67, Ser70 et Glu71 du domaine 1 de l'annexine IV présenté sur la figure 6d.

15. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend une molécule de formule (VII) suivante :

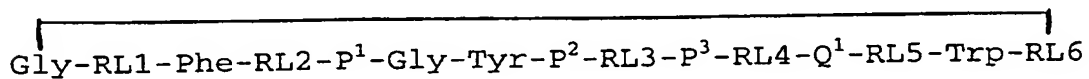


- 5 dans laquelle N^1 à N^3 représentent chacun indépendamment de 1 à 4 acides aminés choisis indépendamment, naturels ou non naturels, et dans laquelle M est un peptide constitué de 1 à 100 acides aminés naturels ou non naturels ;
- 10 dans laquelle RL1, RL2, RL3 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn ; RL4 est choisi indépendamment parmi Asp ou Glu ; et RL5 est choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu, ladite structure étant linéaire ou cyclique.
- 15
16. Structure selon la revendication 15, dans laquelle N^1 représente trois acides aminés, N^2 représente quatre acides aminés, et N^3 représente deux acides aminés.
- 20
17. Structure selon la revendication 15 ou 16, dans laquelle M est un peptide constitué de 33 acides aminés naturels ou non naturels.
- 25
18. Structure selon la revendication 15, dans laquelle la molécule de formule (VII) est une séquence peptidique choisie parmi la séquence peptidique allant de Arg124 à Ser171 dans la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence peptidique allant de
- 30 Arg25 à Glu72 dans la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence peptidique allant de Lys100 à Glu147 dans la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c, la séquence allant de Arg24 à Glu71 dans la

séquence ID n°4 présentée sur la figure 6d, la séquence allant de Arg97 à Asp144 dans la séquence ID n°5 présentée sur la figure 6, ou une séquence modifiée de ces séquences pourvu que RL1, RL2, RL3 et RL6 soient choisis indépendamment parmi Lys, Arg ou Orn, RL4 soit choisi indépendamment parmi Asp ou Glu, et RL5 soit choisi indépendamment parmi Ser, Thr, Asp ou Glu.

19. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins une partie d'une séquence peptidique choisie parmi la séquence ID n°1 présentée sur la figure 6a, la séquence ID n°2 présentée sur la figure 6b, la séquence ID n°3 présentée sur la figure 6c et les séquences ID n°4 et ID n°5 présentées sur la figure 6d, ou une séquence modifiée de celle-ci.

20. Structure chimique ayant une affinité pour un phospholipide chargé négativement, caractérisée en ce qu'elle comprend une séquence peptidique cyclique de formule (VIII) suivante :



25 dans laquelle RL1 et RL6 sont choisis indépendamment parmi Lys, Orn et Arg ; RL2 et RL3 sont Arg ; RL4 et RL5 sont choisis indépendamment parmi Asp et Glu ; dans laquelle P¹, P² et P³ sont choisis indépendamment parmi Ser et Thr ; dans laquelle Q¹ est choisi parmi Gly et Met.

21. Structure chimique selon l'une quelconque des revendications 15 à 19, comprenant en outre un site

calcium où l'ion calcium complexé par ce site constitue un des ligands du phospholipide chargé négativement.

22. Structure selon l'une quelconque des
5 revendications précédentes, ladite structure ayant une affinité pour un phospholipide choisi parmi une phosphatidylsérine, une phosphatidyléthanolamine, un phosphatidylinositol, un acide phosphatidique, et un cardiolipide.

10

23. Assemblage chimique ayant une affinité pour un phospholipide, caractérisé en ce qu'il comprend au moins deux structures chimiques définies dans les revendications 1 à 22, identiques ou différentes,
15 lesdites structures étant liées.

24. Assemblage chimique selon la revendication 23, dans lequel au moins une des structures chimiques est une des structures chimiques définies dans les
20 revendications 15 à 22.

25. Procédé de fabrication d'une structure chimique définie dans l'une quelconque des revendications 11 à 22 précédentes, caractérisé en ce
25 qu'il comprend les étapes de préparation d'un cDNA comprenant une séquence de base codant pour ladite structure chimique, d'insertion du cDNA dans un vecteur d'expression approprié, de transformation d'une cellule hôte appropriée pour une réplication du plasmide et la
30 fabrication de ladite structure par traduction dudit cDNA.

26. Procédé selon la revendication 25, dans lequel le vecteur est un plasmide.

27. Procédé selon la revendication 25, dans lequel
5 le vecteur est le vecteur pGEX-2T.

28. Procédé selon la revendication 25, 26 ou 27, dans lequel la cellule hôte appropriée est *E. Coli*.

10 29. Utilisation d'une structure chimique telle que définie dans les revendications 1 à 22 pour préparer un médicament.

15 30. Utilisation d'un assemblage chimique tel que défini dans la revendication 23 ou 24 pour préparer un médicament.

20 31. Utilisation selon la revendication 29 ou 30, dans laquelle le médicament est choisi parmi un médicament destiné au traitement d'une thrombose, un médicament destiné au traitement d'une tumeur, un médicament ayant une action anti-inflammatoire.

25 32. Utilisation d'une structure telle que définie dans les revendications 1 à 21 pour la fabrication d'un matériau de recouvrement d'un biomatériau thrombogène.

30 33. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend une structure telle que définie dans les revendications 1 à 22 couplée à une molécule de marquage.

34. Composé de marquage caractérisé en ce qu'il comprend un assemblage tel que défini dans la revendication 23 ou 24 couplé à une molécule de marquage.

5

35. Composé selon la revendication 33 ou 34 dans lequel la molécule de marquage est choisie parmi une molécule fluorescente, le complexe avidine-biotine, un radioélément, et un composé paramagnétique.

10

36. Trousse de diagnostic comprenant un composé selon l'une quelconque des revendications 33 à 35.

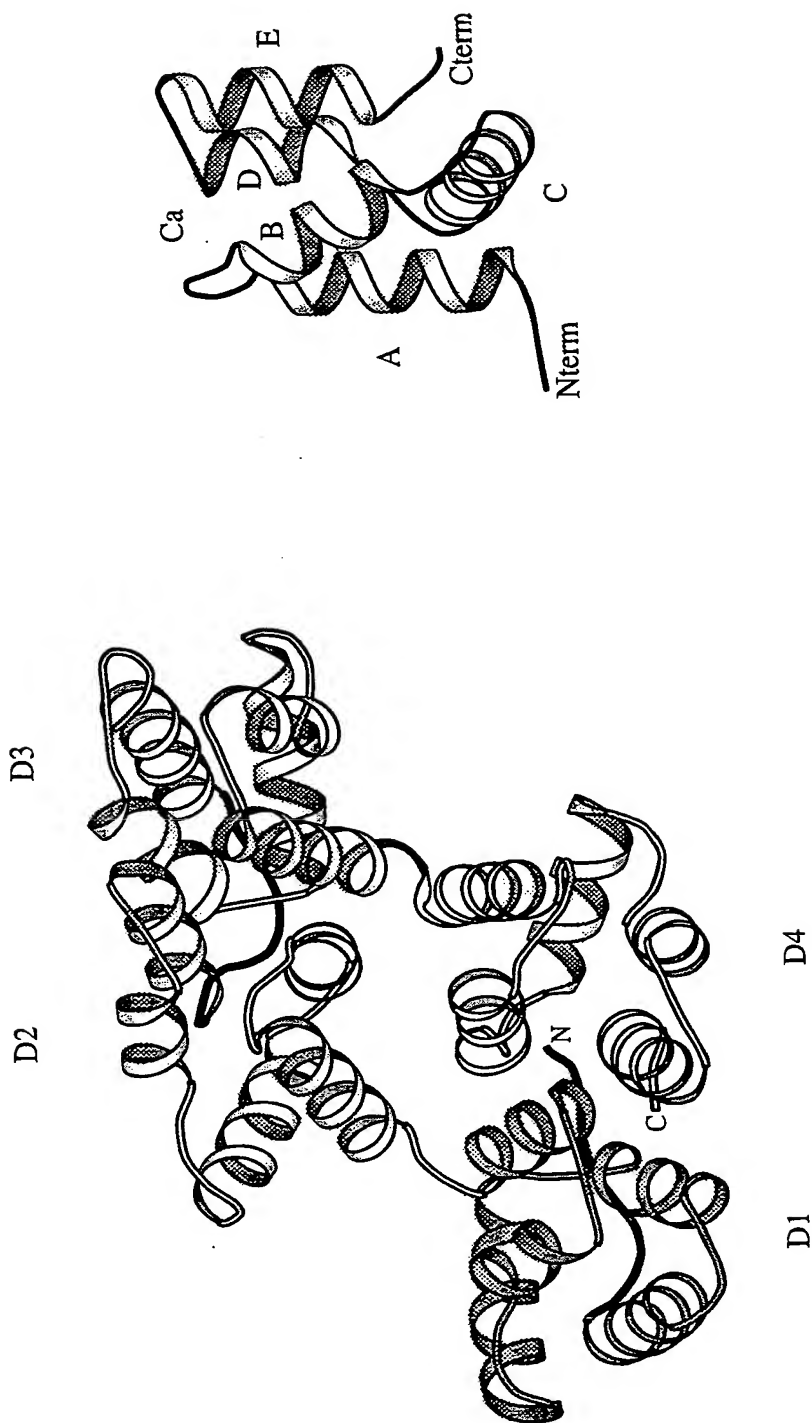
37. Trousse de diagnostic selon la revendication 36, comprenant en outre un réactif adéquat permettant de détecter ladite molécule de marquage.

38. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

39. Trousse d'analyse et de détection de charges négatives à la surface de cellules, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.

40. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend une structure selon l'une quelconque des revendications 1 à 22 couplée à un marqueur.

41. Trousse d'analyse et de détection de microvésicules dans le sang, caractérisée en ce qu'elle comprend un assemblage selon la revendication 23 ou 24 couplé à un marqueur.



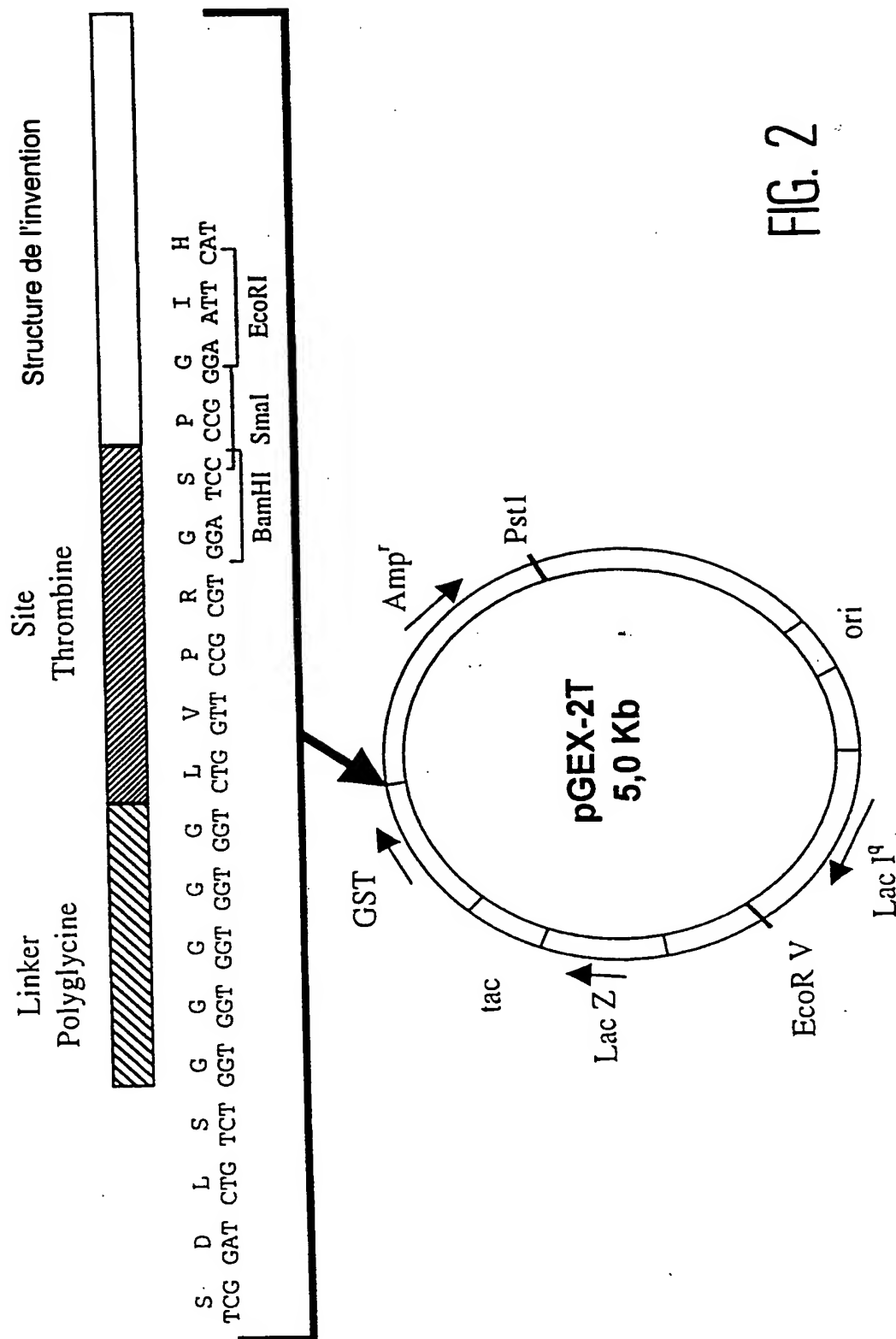


FIG. 2

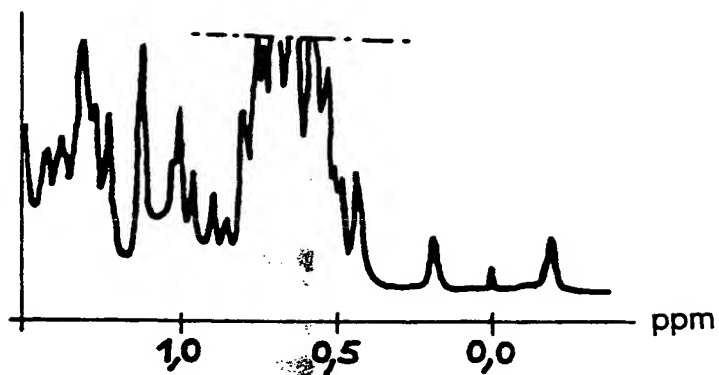


FIG. 3

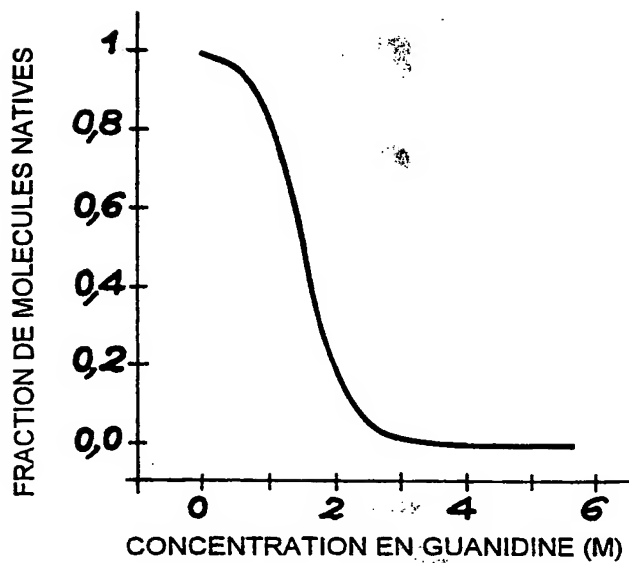


FIG. 4

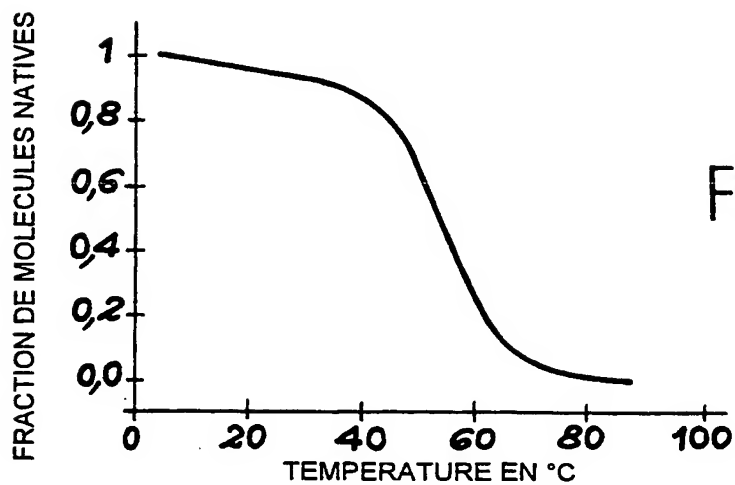


FIG. 5

4/10

Séquence ID n°1

Domaine 2	Met	Ala	Met	Val	Ser	Glu	Phe	Leu	Lys	Gln	Ala	Trp	Phe	Ile
	1				5					10				
	Glu	Asn	Glu	Glu	Gln	Glu	Tyr	Val	Gln	Thr	Val	Lys	Ser	Ser
	15				20					25				
	Lys	Gly	Gly	Pro	Gly	Ser	Ala	Val	Ser	Pro	Tyr	Pro	Thr	Phe
	30				35					40				
	Asn	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Ala	Leu	His	Lys	Ala	Ile	Met	
		45						50				55		
	Val	Lys	Gly	Val	Asp	Glu	Ala	Thr	Ile	Ile	Asp	Ile	Leu	Thr
			60					65					70	
	Lys	Arg	Asn	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Gln	Ile	Lys	Ala	Ala	Tyr
				75						80				
	Leu	Gln	Glu	Thr	Gly	Lys	Pro	Leu	Asp	Glu	Thr	Leu	Lys	Lys
	85					90				95				
	Ala	Leu	Thr	Gly	His	Leu	Glu	Glu	Val	Val	Leu	Ala	Leu	Leu
		100					105					110		
	Lys	Thr	Pro	Ala	Gln	Phe	Asp	Ala	Asp	Glu	Leu	Arg	Ala	Ala
			115					120				125		
	Met	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Thr	Leu	Ile	Glu	Ile
			130						135				140	
	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Asn	Lys	Glu	Ile	Arg	Asp	Ile	Asn	Arg
				145						150				
	Val	Tyr	Arg	Glu	Glu	Leu	Lys	Arg	Asp	Leu	Ala	Lys	Asp	Ile
	155					160				165				
	Thr	Ser	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Arg	Asn	Ala	Leu	Leu	Ser
		170					175					180		
	Leu	Ala	Lys	Gly	Asp	Arg	Ser	Glu	Asp	Phe	Gly	Val	Asn	Glu
		185						190					200	
	Asp	Leu	Ala	Asp	Ser	Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	Tyr	Glu	Ala	Gly
			205						210					215
	Glu	Arg	Arg	Lys	Gly	Thr	Asp	Val	Asn	Val	Phe	Asn	Thr	Ile
				220						225				
	Leu	Thr	Thr	Arg	Ser	Tyr	Pro	Gln	Leu	Arg	Arg	Val	Phe	Gln
	230					235					240			
	Lys	Tyr	Thr	Lys	Tyr	Ser	Lys	His	Asp	Met	Asn	Lys	Val	Leu
		245					250					260		
	Asp	Leu	Glu	Leu	Lys	Gly	Asp	Ile	Glu	Lys	Cys	Leu	Thr	Ala
		265						270					275	
	Ile	Val	Lys	Cys	Ala	Thr	Ser	Lys	Pro	Ala	Phe	Phe	Ala	Glu
			280						285					290
	Lys	Leu	His	Gln	Ala	Met	Lys	Gly	Val	Gly	Thr	Arg	His	Lys
				295						300				
	Ala	Leu	Ile	Arg	Ile	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	Met
	305					310					315			
	Asn	Asp	Ile	Lys	Ala	Phe	Tyr	Gln	Lys	Met	Tyr	Gly	Ile	Ser
		320					325					330		
	Leu	Cys	Gln	Ala	Ile	Leu	Asp	Glu	Thr	Lys	Gly	Asp	Tyr	Glu
			335					340					345	
	Lys	Ile	Leu	Val	Ala	Leu	Cys	Gly	Gly	Asn				
				350						355				

FIG. 6A: Annexine I humaine

Séquence ID n°2

Domaine 1	Met	Ala	Gln	Val	Leu	Arg	Gly	Thr	Val	Thr	Asp	Phe	Pro	Gly
	1				5					10				
	Phe	Asp	Glu	Arg	Ala	Asp	Ala	Glu	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met
	15				20					25				
	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Ser	Ile	Leu	Thr	Leu	Leu
		30					35					40		
	Thr	Ser	Arg	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Ser	Ala	Ala
		45					50					55		
	Phe	Lys	Thr	Leu	Phe	Gly	Arg	Asp	Leu	Leu	Asp	Asp	Leu	Lys
			60					65				70		
	Ser	Glu	Leu	Thr	Gly	Lys	Phe	Glu	Lys	Leu	Ile	Val	Ala	Leu
					75				75					
	Met	Lys	Pro	Ser	Arg	Leu	Tyr	Asp	Ala	Tyr	Glu	Leu	Lys	His
	80					85				90				
	Ala	Leu	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Thr	Glu
		95					100				105			
	Ile	Ile	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ala	Ile	Lys
		110						115				120		
	Gln	Val	Tyr	Glu	Glu	Glu	Tyr	Gly	Ser	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp
			125						130				135	
	Val	Val	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Gln	Arg	Met	Leu	Val
					140					145				
	Val	Leu	Leu	Gln	Ala	Asn	Arg	Asp	Pro	Asp	Ala	Gly	Ile	Asp
	150					155				160				
	Glu	Ala	Gln	Val	Glu	Gln	Asp	Ala	Gln	Ala	Leu	Phe	Gln	Ala
		165					170				175			
	Gly	Glu	Leu	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Glu	Lys	Phe	Ile	Thr
			180					185				190		
	Ile	Phe	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Val	Phe
			195						200				205	
	Asp	Lys	Tyr	Met	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu	Thr
				205						210				
	Ile	Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu
	215					220				230				
	Ala	Val	Val	Lys	Ser	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala
		235					240				245			
	Glu	Thr	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Asp
			250					255				260		
	His	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp
				265					270				275	
	Leu	Phe	Asn	Ile	Arg	Lys	Glu	Phe	Arg	Lys	Asn	Phe	Ala	Thr
				280						285				
	Ser	Leu	Tyr	Ser	Met	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr
	290					295				300				
	Lys	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp		
		305					310					315		

FIG. 6B : Annexine V humaine

Séquence ID n°3

Domaine 2	Met	Ala	Ser	Ile	Trp	Val	Gly	His	Arg	Gly	Thr	Val	Arg	Asp
	1				5					10				
	Tyr	Pro	Asp	Phe	Ser	Pro	Ser	Val	Asp	Ala	Glu	Ala	Ile	Gln
	15					20				25				
	Lys	Ala	Ile	Arg	Gly	Ile	Gly	Thr	Asp	Glu	Lys	Met	Leu	Ile
		30				35					40			
	Ser	Ile	Leu	Thr	Glu	Arg	Ser	Asn	Ala	Gln	Arg	Gln	Leu	Ile
		45					50					55		
	Val	Lys	Glu	Tyr	Gln	Ala	Ala	Tyr	Gly	Lys	Glu	Leu	Lys	Asp
			60					65					70	
	Asp	Leu	Lys	Gly	Asp	Leu	Ser	Gly	His	Phe	Glu	His	Leu	Met
				75						80				
	Val	Ala	Leu	Val	Thr	Pro	Pro	Ala	Val	Phe	Asp	Ala	Lys	Gln
	85					90					95			
	Leu	Lys	Lys	Ser	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asn	Glu	Asp	Ala
		100					105					110		
	Leu	Ile	Glu	Ile	Leu	Thr	Thr	Arg	Thr	Ser	Arg	Gln	Met	Lys
			115					120					125	
	Asp	Ile	Ser	Gln	Ala	Tyr	Tyr	Thr	Val	Tyr	Lys	Lys	Ser	Leu
				130					135					140
	Gly	Asp	Asp	Ile	Ser	Ser	Glu	Thr	Ser	Gly	Asp	Phe	Arg	Lys
					145					150				
	Ala	Leu	Leu	Thr	Leu	Ala	Asp	Gly	Arg	Arg	Asp	Glu	Ser	Leu
	155					160					165			
	Lys	Val	Asp	Glu	His	Leu	Ala	Lys	Gln	Asp	Ala	Gln	Ile	Leu
		170					175					180		
	Tyr	Lys	Ala	Gly	Glu	Asn	Arg	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Lys
			185					190					195	
	Phe	Thr	Glu	Ile	Leu	Cys	Leu	Arg	Ser	Phe	Pro	Gln	Leu	Lys
				200					205					210
	Leu	Thr	Phe	Asp	Glu	Tyr	Arg	Asn	Ile	Ser	Gln	Lys	Asp	Ile
					215					220				
	Val	Asp	Ser	Ile	Lys	Gly	Glu	Leu	Ser	Gly	His	Phe	Glu	Asp
	225					230					235			
	Leu	Leu	Leu	Ala	Ile	Val	Asn	Cys	Val	Arg	Asn	Thr	Pro	Ala
		240					245					250		
	Phe	Leu	Ala	Glu	Arg	Leu	His	Arg	Ala	Leu	Lys	Gly	Ile	Gly
			255					260					270	
	Thr	Asp	Glu	Phe	Thr	Leu	Asn	Arg	Ile	Met	Val	Ser	Arg	Ser
				275					280					285
	Glu	Ile	Asp	Leu	Leu	Asp	Ile	Arg	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	His
					290					295				
	Tyr	Gly	Tyr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Ala	Ile	Lys	Ser	Asp	Thr	Ser
	300					305					310			
	Gly	Asp	Tyr	Glu	Ile	Thr	Leu	Leu	Lys	Ile	Cys	Gly	Gly	Asp
		315					320					325		

FIG. 6C : Annexine III humaine

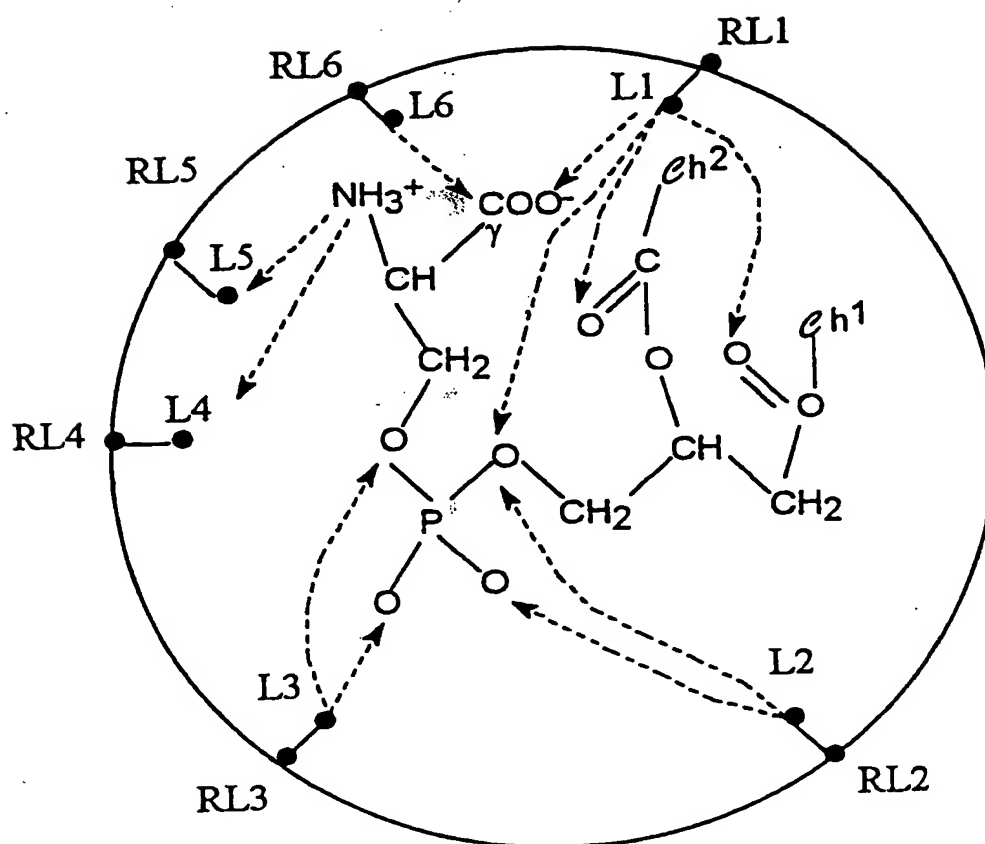
Séquence ID n°4

Domaine 1	Met	Ala	Thr	Lys	Gly	Gly	Thr	Val	Lys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe
	1				5					10				
	Asn	Ala	Met	Glu	Asp	Ala	Gln	Thr	Leu	Arg	Lys	Ala	Met	Lys
	15				20					25				
	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Glu	Asp	Ala	Ile	Ile	Ser	Val	Leu	Ala
	30				35					40				
	Tyr	Arg	Asn	Thr	Ala	Gln	Arg	Gln	Glu	Ile	Arg	Thr	Ala	Tyr
	45				50					55				
	Lys	Ser	Thr	Ile	Gly	Arg	Asp	Leu	Ile	Asp	Asp	Leu	Lys	Ser
	60				65					70				
	Glu	Leu	Ser	Gly	Asn	Phe	Glu	Gln	Val	Ile	Val	Gly	Met	Met
	75				80									
	Thr													
	85													

Séquence ID n°5

Domaine 2	Pro	Thr	Val	Leu	Tyr	Asp	Val	Gln	Glu	Leu	Gln	Arg	Lys	
	86					90					95			
	Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Glu	Gly	Cys	Leu	Ile	Glu
	100					105					110			
	Ile	Leu	Ala	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Ile	Arg	Arg	Ile	Asn
	115					120					125			
	Gln	Thr	Tyr	Gln	Leu	Gln	Tyr	Gly	Arg	Ser	Leu	Glu	Asp	Asp
	130					135					140			
	Ile	Arg	Ser	Asp	Thr	Ser	Phe	Met	Phe	Gln	Arg	Val	Leu	Val
	145					150								
	Ser	Leu	Ser	Ala	Gly	Gly	Arg	Asp	Glu	Gly	Asn	Tyr	Leu	Asp
	155				160					170				
	Asp	Ala	Leu	Val	Arg	Gln	Asp	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Glu	Ala
	175					180					185			
	Gly	Glu	Lys	Lys	Trp	Gly	Thr	Asp	Glu	Val	Lys	Phe	Leu	Thr
	190					195					200			
	Val	Leu	Cys	Ser	Arg	Asn	Arg	Asn	His	Leu	Leu	His	Val	Phe
	205					210					215			
	Asp	Glu	Tyr	Lys	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Asp	Ile	Glu	Gln	Ser
	220					225								
	Ile	Lys	Ser	Glu	Thr	Ser	Gly	Ser	Phe	Glu	Asp	Ala	Leu	Leu
	230				235					240				
	Ala	Ile	Val	Lys	Cys	Met	Arg	Asn	Lys	Ser	Ala	Tyr	Phe	Ala
	245					250					255			
	Glu	Lys	Leu	Tyr	Lys	Ser	Met	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Asp	Asp
	260					265					270			
	Asn	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	Val	Ser	Arg	Ala	Glu	Ile	Asp
	275					280					285			
	Met	Leu	Asp	Ile	Arg	Ala	His	Phe	Lys	Arg	Leu	Tyr	Gly	Lys
	290					295								
	Ser	Leu	Tyr	Ser	Phe	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	Gly	Asp	Tyr
	300				305					310				
	Arg	Lys	Val	Leu	Leu	Val	Leu	Cys	Gly	Gly	Asp	Asp		
	315					320					325			

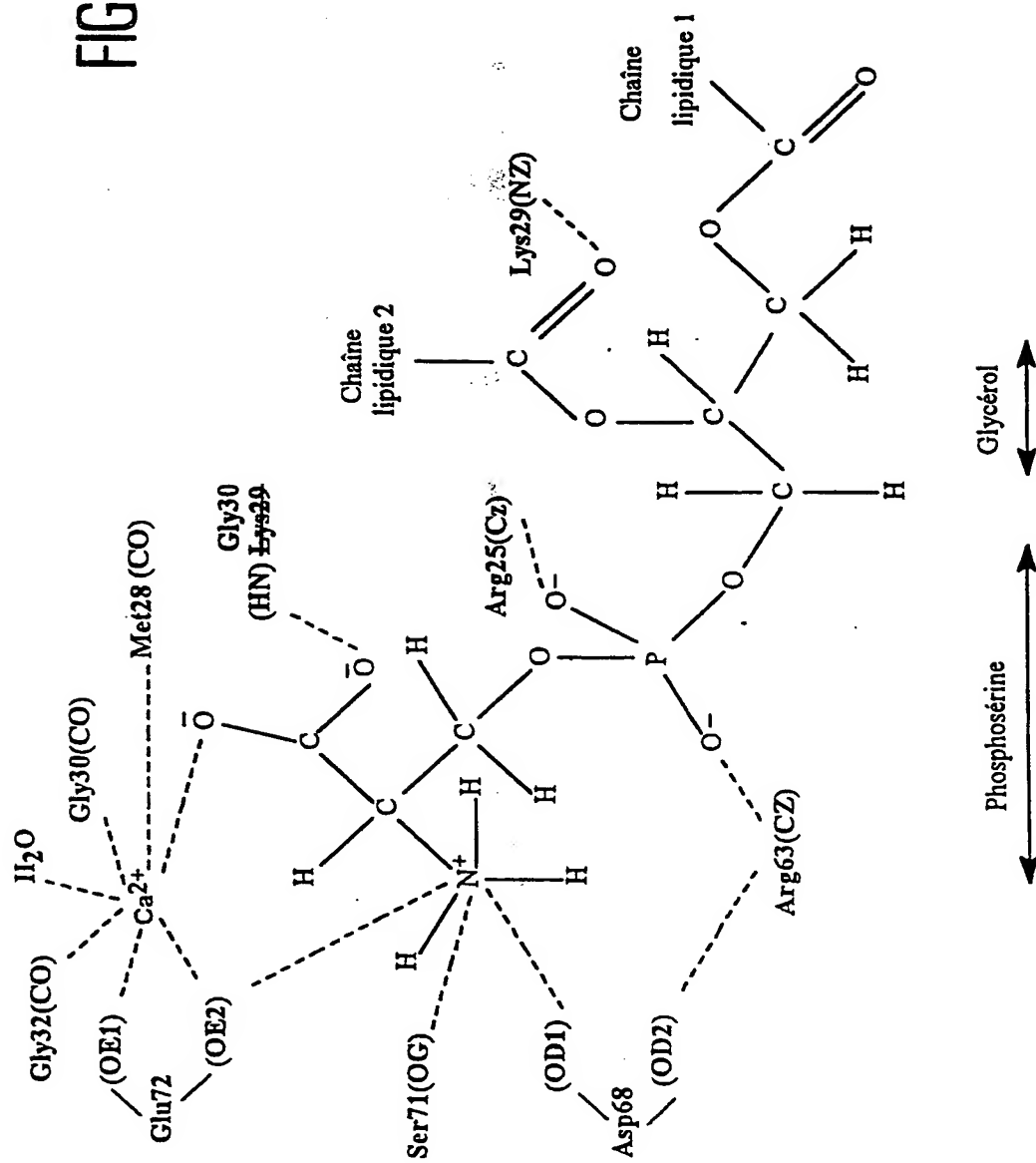
FIG. 6D: Annexine IV humaine



Composé (I) + phosphatidylsérine

FIG. 7

FIG. 8



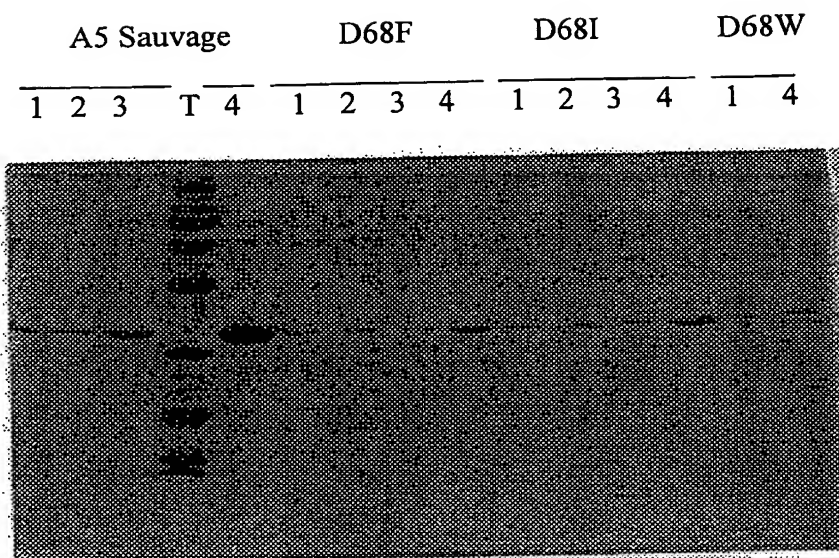


FIG. 9 A

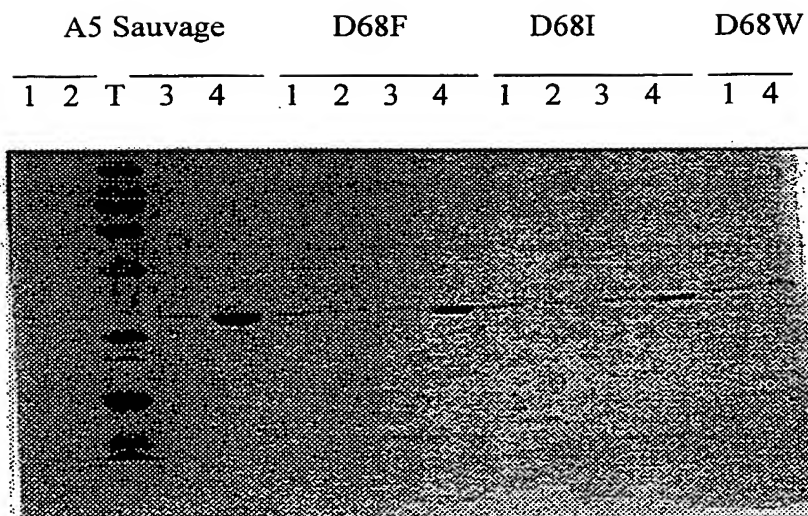


FIG. 9 B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 99/02329

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/47 A61K38/17 G01N33/58 G01N33/86		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K A61K G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	F. CORDIER-OCHSENBEIN ET AL.: "Exploring the folding pathways of annexin I, a multidomain protein. I." J. MOL. BIOL., vol. 279, June 1998 (1998-06), pages 1163-1175, XP002107103 page 1173, paragraph 1	1-19, 21, 22, 25-28
X	K. SANO ET AL.: "Isolation and sequence of a c-DNA clone for the rat pulmonary surfactant-associated protein (PSP-A)" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 144, no. 1, 1987, pages 367-374, XP002107104 ORLANDO, FL US Seq 27-74 page 368, line 1; figures 2,3	1-10, 22, 29
-/-		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
* Special categories of cited documents : <div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div style="width: 45%;"> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the International filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="width: 45%;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">12 January 2000</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">20/01/2000</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Cervigni, S</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Inter n. Application No
 PCT/FR 99/02329

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	F. MACQUAIRE ET AL: "Proton NMR Conformational study of an annexin I fragment" BIOCHEMISTRY, vol. 32, 1993, pages 7244-7254, XP002107105 abstract page 7244 ---	1-13, 19, 21, 22
X	WO 91 09953 A (ZYMOGENETICS INC) 11 July 1991 (1991-07-11) page 10 ---	1-13, 19, 21-30
X	WO 92 19279 A (UNIV WASHINGTON) 12 November 1992 (1992-11-12) cited in the application page 8 page 18 -page 19 ---	1-13, 19, 21-32
X	J.D. ERNST ET AL: "Annexins possess functionality distinguishable Ca2+ and phospholipid binding domains" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 200, no. 2, 1994, pages 867-876, XP002107106 ORLANDO, FL US page 867 -page 868; figure 1 ---	1-19, 21-28
X	US 5 627 036 A (REUTELINGSPERGER CHRISTIAAN) 6 May 1997 (1997-05-06) abstract; claims ---	1-13, 19, 21-24, 33-41
A	R. HUBER ET AL: "The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 A resolution" FEBS LETTER, vol. 275, no. 1,2, 1990, pages 15-21, XP002107107 page 17, column 2 page 18, column 2, last line -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/FR 99/02329

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Observation: Although Claims 29-31 concern a method for treatment of the human/animal body, the search was carried out on the basis of the effects attributed to the product/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

informing patent family members

Inter national application No

PCT/FR 93/02329

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9109953	A	11-07-1991	US 5225537 A	06-07-1993
			AU 7030691 A	24-07-1991
WO 9219279	A	12-11-1992	CA 2086437 A	10-11-1992
			EP 0538459 A	28-04-1993
			US 5632986 A	27-05-1997
US 5627036	A	06-05-1997	US 5955437 A	21-09-1999
			AT 164083 T	15-04-1998
			AU 642202 B	14-10-1993
			AU 7071191 A	24-07-1991
			CA 2070647 A	28-06-1991
			DE 4040817 A	04-07-1991
			DE 59010815 D	23-04-1998
			WO 9109628 A	11-07-1991
			EP 0509026 A	21-10-1992
			EP 0806670 A	12-11-1997
			ES 2113372 T	01-05-1998
			HU 209650 B	28-09-1994
			NO 305276 B	03-05-1999
			NZ 236620 A	24-03-1997
			PT 96385 A,B	31-10-1991

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

De XXXXXXXXXX Internationale No
PCT/FR 99/02329

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C07K14/47 A61K38/17 G01N33/58 G01N33/86		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 7 C07K A61K G01N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	F. CORDIER-OCHSENBEIN ET AL.: "Exploring the folding pathways of annexin I, a multidomain protein. I." J. MOL. BIOL., vol. 279, juin 1998 (1998-06), pages 1163-1175, XP002107103 page 1173, alinéa 1	1-19, 21, 22, 25-28
X	K. SANO ET AL.: "Isolation and sequence of a c-DNA clone for the rat pulmonary surfactant-associated protein (PSP-A)" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 144, no. 1, 1987, pages 367-374, XP002107104 ORLANDO, FL US Seq 27-74 page 368, ligne 1; figures 2,3 <div style="text-align: center;">-/--</div>	1-10, 22, 29
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Catégories spéciales de documents cités:</p> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"&" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée <div style="text-align: center;">12 janvier 2000</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale <div style="text-align: center;">20/01/2000</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé <div style="text-align: center;">Cervigni, S</div>

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dernière Internationale No

PCT/FR 99/02329

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	F. MACQUAIRE ET AL: "Proton NMR Conformational study of an annexin I fragment" BIOCHEMISTRY, vol. 32, 1993, pages 7244-7254, XP002107105 abrégé page 7244 ---	1-13, 19, 21, 22
X	WO 91 09953 A (ZYMOGENETICS INC) 11 juillet 1991 (1991-07-11) page 10 ---	1-13, 19, 21-30
X	WO 92 19279 A (UNIV WASHINGTON) 12 novembre 1992 (1992-11-12) cité dans la demande page 8 page 18 -page 19 ---	1-13, 19, 21-32
X	J.D. ERNST ET AL: "Annexins possess functionality distinguishable Ca ²⁺ and phospholipid binding domains" BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS., vol. 200, no. 2, 1994, pages 867-876, XP002107106 ORLANDO, FL US page 867 -page 868; figure 1 ---	1-19, 21-28
X	US 5 627 036 A (REUTELINGSPERGER CHRISTIAAN) 6 mai 1997 (1997-05-06) abrégé; revendications ---	1-13, 19, 21-24, 33-41
A	R. HUBER ET AL: "The calcium binding sites in human annexin V by crystal structure analysis at 2.0 Å resolution" FEBS LETTER, vol. 275, no. 1,2, 1990, pages 15-21, XP002107107 page 17, colonne 2 page 18, colonne 2, dernière ligne -----	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

La demande internationale n°

PCT/FR 99/ 02329

Cadre I Observations – lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. ☒ Les revendications n^{os} se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Bien que les revendications 29-31 concernent une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit/à la composition.
2. ☐ Les revendications n^{os} se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. ☐ Les revendications n^{os} sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations – lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. ☐ Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. ☐ Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. ☐ Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n^{os}
4. ☐ Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications: elle est couverte par les revendications n^{os}

Remarque quant à la réserve

- ☐ Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- ☐ Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres des familles de brevets

Dem. Internationale No
PCT/FR 93/02329

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 9109953 A	11-07-1991	US 5225537 A AU 7030691 A	06-07-1993 24-07-1991
WO 9219279 A	12-11-1992	CA 2086437 A EP 0538459 A US 5632986 A	10-11-1992 28-04-1993 27-05-1997
US 5627036 A	06-05-1997	US 5955437 A AT 164083 T AU 642202 B AU 7071191 A CA 2070647 A DE 4040817 A DE 59010815 D WO 9109628 A EP 0509026 A EP 0806670 A ES 2113372 T HU 209650 B NO 305276 B NZ 236620 A PT 96385 A, B	21-09-1999 15-04-1998 14-10-1993 24-07-1991 28-06-1991 04-07-1991 23-04-1998 11-07-1991 21-10-1992 12-11-1997 01-05-1998 28-09-1994 03-05-1999 24-03-1997 31-10-1991

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)